

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Química Física II
(Físico Química Farmacéutica)



TESIS DOCTORAL

**Quitooligosacáridos bifuncionales: relación entre características
químico-físicas y propiedades biológicas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ángela María Sánchez Sánchez

Directores

Ángeles Heras Caballero
Florentina Niuris Acosta Contreras
M^a Ángeles López Mengíbar

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Física II (Fisicoquímica Farmacéutica)



**QUITOOLIGOSACÁRIDOS BIOFUNCIONALES: RELACIÓN ENTRE
CARACTERÍSTICAS QUÍMICO-FÍSICAS Y PROPIEDADES BIOLÓGICAS**

MEMORIA DE TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR

ÁNGELA MARÍA SÁNCHEZ SÁNCHEZ

Bajo la dirección de los doctoras

Ángeles Heras Caballero

Florentina Niuris Acosta Contreras

M^a Ángeles López Mengíbar

MADRID, 2015

INFORME DE LOS DIRECTORES

La Dra. Ángeles Heras Caballero, Profesora Titular (Acreditada CU) del Departamento de Química-Física II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, miembro del Instituto de Estudios Biofuncionales y directora responsable del grupo 920071-UCM “Investigaciones en el sistema quitina/quitosano”.

La Dra. Florentina Niuris Acosta Contreras, Profesora del Departamento de Química-Física II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

La Dra. M^a Ángeles López Mengíbar miembro de Infiquis S.L. y del Instituto de Estudios Biofuncionales de la Universidad Complutense de Madrid.

CERTIFICAN:

Que la Licenciada Dña. Ángela M^a Sánchez Sánchez ha realizado la labor investigadora correspondiente a la Tesis Doctoral titulada “Quitooligosacáridos biofuncionales: relación entre características químico-físicas y propiedades biológicas” bajo su dirección en el Instituto de Estudios Biofuncionales y en el Dpto. Química-Física II de la Facultad de Farmacia de la UCM, y reuniendo los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor.

Concluido el trabajo experimental y bibliográfico, autorizan su presentación para que sea juzgado por el tribunal correspondiente nombrado a tal efecto. Y para que conste, a los efectos oportunos, firman el presente documento.

Madrid, 22 de octubre de 2015

Dra. Ángeles Heras Caballero

Dra. Florentina Niuris Acosta Contreras

Dra. M^a Ángeles López Mengíbar

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Química-Física II (Fisicoquímica Farmacéutica) de la UCM y en el Instituto de Estudios Biofuncionales, gracias a una Ayuda de Formación de Personal de Investigación del MINECO, MAT2010-21621-C02-01.

ÍNDICE.....	7
ABREVIATURAS.....	13
I. INTRODUCCIÓN	15
1. QUITOSANOS, POLÍMEROS PARA LA OBTENCIÓN DE QUITOOLIGOSACÁRIDOS	17
1.1. Caracterización fisicoquímica	19
1.2. Solubilidad	23
1.3. Modificación del peso molecular promedio	24
1.4. Modificación del grado de acetilación	25
1.5. Biocompatibilidad	26
2. QUITOOLIGOSACÁRIDOS	26
2.1. Métodos de obtención y separación de COS	27
2.2. Despolimerización con quitosanas EC1.2.3.132	29
2.3. Características fisicoquímicas	31
3. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS QUITOOLIGOSACÁRIDOS	32
3.1. Actividad antimicrobiana	33
3.1.1. Mecanismo de acción antimicrobiano	33
3.2. Actividad antioxidante	37
3.2.1. Métodos de evaluación de la actividad antioxidante	39
3.2.2. Mecanismos de actividad antioxidante	40
3.3. Capacidad de mucoadhesión	42
3.4. Actividad antiinflamatoria	43
3.4.1. Evento inflamatorio	44
3.4.2. Vías de señalización dependientes de la proteína adaptadora MyD88.....	48
II. OBJETIVOS.....	51
III. MATERIALES Y MÉTODOS	55
1. MATERIALES.....	57

2. MUESTRAS DE QUITOSANOS.....	57
3. PURIFICACIÓN DE LOS QUITOSANOS	57
4. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS QUITOSANOS	58
4.1. Determinación del contenido en humedad.....	58
4.2. Determinación del contenido en materia inorgánica.....	58
4.3. Viscosimetría.....	58
4.4. Determinación del grado de acetilación.....	59
4.5. Determinación del peso molecular promedio	59
5. PROCESOS DE OBTENCIÓN DE QUITOOLIGOSACÁRIDOS	60
5.1. Proceso 1.....	60
5.2. Proceso 2.....	60
5.3. Proceso 3.....	60
5.4. Separación y purificación de COS	61
6. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS QUITOOLIGOSACÁRIDOS	62
6.1. Determinación del grado de acetilación.....	62
6.2. Determinación de productos de glicación avanzada de la Reacción de Maillard	62
6.3. Determinación de patrón de acetilación	62
6.4. Determinación del peso molecular promedio y de la distribución de DP	63
6.5. Análisis de la composición intramolecular y de la distribución de DP de COS 2 y COS 3.....	63
6.6. Despolimerización de los COS 1 con quitosanasa específica (CTS) y análisis de los productos por MALDI-TOF-MS	64
7. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS COS	65
7.1. Actividad antibacteriana de los COS.....	65
7.1.1. Materiales	65
7.1.2. Cultivo de cepas	65
7.1.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria	65
7.2. Actividad antioxidante de los COS	66
7.2.1. Materiales	66
7.2.2. Método DPPH.....	67
7.2.3. Método ABTS	67
7.2.4. Método FRAP	68
7.2.5. Método ORAC	68

7.3. Mucoadhesividad de los COS.....	69
7.4. Actividad antiinflamatoria	69
7.4.1. Materiales	69
7.4.2. Ensayos <i>in vivo</i>	71
7.4.2.1. Animales y estabulación.....	71
7.4.2.2. Inducción de peritonitis aguda en ratón y análisis de poblaciones celulares mediante citometría de flujo.....	71
7.4.3. Ensayos <i>in vitro</i>	72
7.4.3.1. Cultivo de macrófagos Raw 264.7	72
7.4.3.2. Ensayo de citotoxicidad	72
7.4.3.3. Estimulación <i>in vitro</i> con LPS y/o COS e inmunodetección de proteínas (Western Blot)	73
7.4.3.4. Estimulación precedida de incubación con inhibidores	74
7.4.3.5. Detección de especies reactivas del oxígeno	74
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	75

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 77

1. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS QUITOSANOS	79
1.1. Contenido en humedad y en impurezas.....	79
1.2. Viscosidad intrínseca	81
1.3. Grado de acetilación	81
1.4. Peso molecular promedio.....	82
2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS QUITOOLIGOSACÁRIDOS Y DE LOS QUITOSANOS MODIFICADOS	83
2.1. Determinación del grado de acetilación y análisis estructural	84
2.2. Determinación del patrón de acetilación	92
2.3. Determinación del peso molecular promedio	95
2.4. Análisis de la distribución de grados de polimerización y de la composición intramolecular	101
2.4.1. Análisis de la composición intramolecular y la distribución de grados de polimerización de COS 3.....	101
3. ESTUDIO DE PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS QUITOOLIGOSACÁRIDOS.....	107
3.1. Evaluación de la actividad antibacteriana de los COS	108

3.1.1. Actividad antimicrobiana de los COS procedentes QsB frente a <i>Escherichia coli</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>	109
3.1.2. Estudio de la composición intramolecular de los COS 1	112
3.1.3. Relación entre la actividad antibacteriana de COS 1 y su composición intramolecular	114
3.2. Evaluación de la actividad antioxidante de los COS	117
3.2.1. Evaluación de la capacidad para atrapar radicales libres ABTS y DPPH	117
3.2.2. Evaluación del poder reductor (FRAP)	119
3.2.3. Evaluación de la capacidad de absorción de radicales del oxígeno.....	120
3.2.4. Relación entre actividad antioxidante de los COS y sus características fisicoquímicas.....	122
3.3. Evaluación de la mucoadhesividad de los COS	130
3.4. Evaluación de las propiedades antiinflamatorias de los COS	134
3.4.1. Estudio de la implicación de los COS en la respuesta inflamatoria <i>in vivo</i>	135
3.4.2. Estudio de la implicación de los COS en la respuesta inflamatoria <i>in vitro</i>	137
3.4.2.1. Citotoxicidad de los COS en macrófagos Raw 264.7	138
3.4.2.2. Efecto de los COS en vías de señalización intracelular activadas por LPS	139
3.4.2.3. Efecto de los COS sobre el estrés oxidativo generado por H ₂ O ₂	144
3.4.3. Estudio de la distribución de grados de polimerización y la composición intramolecular de los COS 2	146
3.4.4. Relación entre la actividad antiinflamatoria de COS 2 y sus características fisicoquímicas.....	149
3.4.5. Relación entre actividad proinflamatoria de COS 2 y sus características fisicoquímicas.....	153
V. CONCLUSIONES	157
VI. BIBLIOGRAFÍA	161
ÍNDICE DE TABLAS	187

ÍNDICE DE FIGURAS	189
ANEXO I	193
ANEXO II	197
ABSTRACT	201

ABREVIATURAS

ζ	Potencial zeta
$[\eta]$	Viscosidad intrínseca
$^1\text{H-RMN}$	Resonancia magnética nuclear de protón
$^{13}\text{C-RMN}$	Resonancia magnética nuclear de carbono
A0	Oligómeros completamente desacetilados
A	Monómero de N-acetilglucosamina
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico
AGEs	Productos de glicación avanzada de la Reacción de Maillard
AM	2,5-anhidro-D-manosa del extremo reductor del COS
ASTM	American Society for Testing and Materials
COS	Quitooligosacáridos
CTS	Quitosanasa específica de <i>Alternaria alternata</i>
D	Monómero de N-glucosamina
DP	Grado de polimerización
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidracil
DA	Grado de acetilación
FBS	Suero fetal bovino
FRAP	Capacidad reductora
HAT	Transferencia de átomos de hidrógeno
HMF	5-hidroximetil-2-furfural
HP-SEC	Cromatografía de exclusión molecular de alta presión
IP	Inyección intraperitoneal
LMWC	Quitosanos de bajo peso molecular
LPS	Lipopolisacárido
MALDI-TOF-MS	Espectrometría de masas de ionización láser asistida por matriz
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MIC	Concentración mínima inhibitoria
M_w	Peso molecular
\overline{M}_w	Peso molecular promedio en masa
NFκB	Factor nuclear KB
ORAC	Capacidad de absorción de radicales del oxígeno
P1	Proceso 1

P2	Proceso 2
P3	Proceso 3
PA	Patrón de acetilación
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Tampón fosfato salino
PDI	Índice de polidispersidad
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
Qs	Quitosano
QSS	Quitosanasa EC.1.2.3.132
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SET	Transferencia de electrones
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TLRs	Receptores tipo toll
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UF	Ultrafiltración
UFC	Unidades formadoras de colonias
UHPLC-ESI-IT-MS	Cromatografía de afinidad de alta presión acoplado a espectrometría de masas con ionización por electroespray

I. INTRODUCCIÓN

1. QUITOSANOS, POLÍMEROS PARA LA OBTENCIÓN DE QUITOOLIGOSACÁRIDOS

Los polisacáridos son biomoléculas poliméricas formadas por la unión de monosacáridos, que en la naturaleza cumplen función de reserva energética o soporte estructural (Peña *et al.*, 2004). Estas macromoléculas, así como sus derivados, presentan un gran potencial de aplicaciones biotecnológicas, debido a su origen natural y su elevada disponibilidad.

La quitina es un polisacárido estructural y después de la celulosa, es el segundo polímero más abundante en la naturaleza, llegándose a generar más de 10 gigatoneladas anuales (Prashanth *et al.*, 2007). Se encuentra en una matriz compleja unida a proteínas, sales minerales u otros polisacáridos, formando parte de las paredes celulares de hongos, y del resistente exoesqueleto de los artrópodos (arácnidos, insectos y artrópodos) (Rinaudo, 2006). En concreto, la principal fuente industrial de quitina procede del tratamiento de caparazones de crustáceos (Goycoolea *et al.*, 2000), a través del cual estos productos son sometidos a condiciones ácidas para eliminar el carbonato cálcico, componente mayoritario, seguido de un tratamiento alcalino para extraer el componente proteico. Se suele finalizar el proceso con una decoloración mediante la extracción de pigmentos, y las condiciones empleadas se deben adaptar según la fuente de quitina (Rinaudo, 2006).

La quitina se compone de unidades de 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucosa unidas mediante enlaces β (1-4) y es altamente insoluble en agua y en ácidos orgánicos (Rinaudo, 2006). En su estado nativo, la quitina se dispone en microfibrillas cristalinas ordenadas, que junto con la configuración β de los enlaces glicosídicos, permite la formación de fuertes enlaces de hidrógeno intermoleculares, otorgando una fuerte estabilidad a la estructura. La cuestión de su solubilidad es el principal problema que afecta tanto a su caracterización como a su procesamiento y posterior uso (Younes *et al.*, 2015).

El proceso de desacetilación parcial de la quitina conduce a la obtención de polímeros solubles en ácidos orgánicos, los quitosanos, de gran potencial en cuanto a sus aplicaciones. Por tanto, el quitosano es un polisacárido lineal constituido por unidades de 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucosa (N-acetilglucosamina) y 2-amino-2-deoxi- β -D-glucosa (N-glucosamina) unidas mediante enlaces glicosídicos β (1-4), que puede presentar diferentes proporciones de N-acetilglucosamina. Debido a su estructura cristalina, el quitosano no es hidrosoluble a pH fisiológico, principalmente debido a la formación de puentes de hidrógeno intra- e intermoleculares entre los residuos acetilados (Kurita *et al.*, 1991). Sin embargo, en ácidos débiles, tanto orgánicos como inorgánicos, los grupos amino libres del quitosano se protonan,

formándose un polícatión soluble. La presencia de grupos amino en la estructura de la molécula convierte a este polímero en un polielectrolito catiónico natural con un $pK_a \sim 6.5$, lo que le confiere propiedades muy particulares.

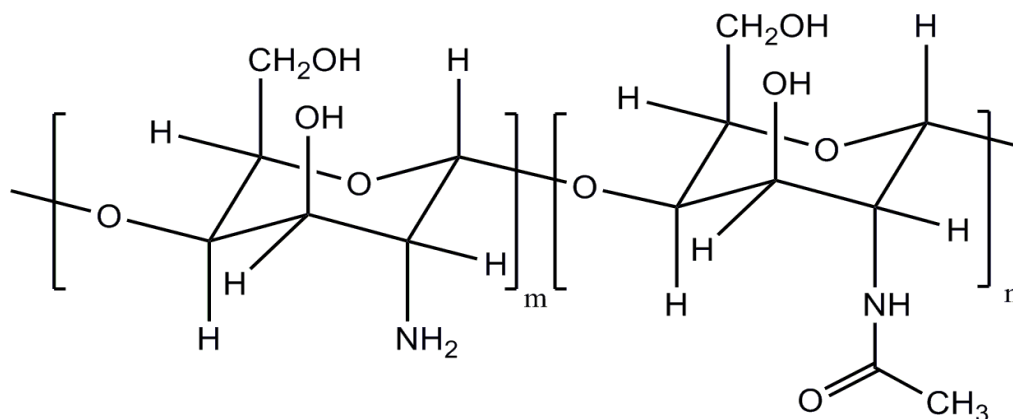


Figura I.1. Estructura química del quitosano. Elaborada con el programa Chemdraw¹.

La obtención de quitosanos puede realizarse mediante diferentes metodologías. La vía enzimática está basada en la utilización de la enzima quitina desacetilasa, identificada y aislada por primera vez a partir de extractos celulares del hongo *Mucor rouxii*. Esta metodología no resulta muy efectiva ya que la enzima no actúa sobre quitina insoluble, y este hecho requiere una quitina previamente tratada en condiciones ácidas para favorecer el acceso de la enzima a los grupos acetilo (Aranaz *et al.*, 2009).

El proceso químico, consiste en una reacción de desacetilación en fase homogénea o heterogénea, en función de las condiciones del proceso. La desacetilación heterogénea implica la utilización de un medio fuertemente alcalino (NaOH o KOH al 40-50% p/v), elevadas temperaturas (60-130 °C) y tiempos de reacción cortos (Aiba, 1991; Aiba, 1992; Acosta *et al.*, 1993). Esta reacción en condiciones heterogéneas no ocurre al azar, ya que tiene lugar preferentemente en la región amorfa de la quitina (Kurita *et al.*, 1977), dando lugar a quitosanos con secuencias de N-acetilglucosaminas distribuidas en bloque (Vårum *et al.*, 1991a), y por tanto con regiones altamente acetiladas e insolubles en ácido (Ottøy *et al.*, 1996a). Actualmente se emplea este tratamiento para la obtención de quitosano a gran escala industrial (Kumar *et al.*, 2004).

Por otra parte, una desacetilación homogénea conlleva condiciones más suaves, como concentraciones más moderadas de álcali (~ 13 % p/v), bajas temperaturas y tiempos de

¹ <http://chemdraw-pro.software.informer.com/12.0/>

reacción prolongados, realizándose a veces un pretratamiento de hinchamiento de la quitina (Sannan *et al.*, 1975). Por tanto, en condiciones homogéneas, el proceso de desacetilación de la quitina transcurre de forma aleatoria dando lugar a quitosanos con una distribución aleatoria de monómeros de N-acetilglucosamina (Vårum *et al.*, 1997; Kurita, 1998). No obstante, el hecho de ser una reacción tan prolongada en el tiempo puede conllevar una posible destrucción de la estructura secundaria del polímero, y por este motivo no es tan frecuente emplear dicho método para obtener quitosanos si no es controlando bien estos tiempos (Tsaih *et al.*, 2003).

Se hace imprescindible tener en cuenta la gran versatilidad que puede llegar a tener este biopolímero en cuanto sus características fisicoquímicas, la cual vendrá dada, entre otras variables, por las diferentes formas de obtenerlo. Desafortunadamente, la mayoría de quitosanos comerciales no se obtienen mediante los mismos tipos de procesos y suelen ser muestras heterogéneas (Nguyen *et al.*, 2009), con presencia de impurezas en algunas ocasiones. Por ello, es imprescindible la purificación de este producto y la caracterización cuidadosa de sus parámetros fisicoquímicos con el fin de aplicar eficazmente el quitosano en cada uso particular según las propiedades funcionales deseadas. Entre las numerosas propiedades funcionales que se le atribuyen se encuentran su biodegradabilidad, biocompatibilidad, capacidad filmogénica, actividad antimicrobiana, actividad antifúngica, actividad hipocolesterolémica, actividad antioxidante, mucoadhesión, actividad antiinflamatoria, hemostático y promotor de absorción (Younes *et al.*, 2015; Aranaz *et al.*, 2014).

Debido a su origen natural, tanto la quitina como el quitosano no se pueden definir como una estructura química única, sino como una familia de polímeros que presentan una alta variabilidad en sus propiedades fisicoquímicas. Esta variabilidad no está relacionada sólo con el origen de las muestras, sino también con su método de preparación.

1.1. Caracterización fisicoquímica

Las propiedades funcionales de los diferentes quitosanos vienen determinadas por la estructura y composición de este heteropolisacárido. La fuente de procedencia de la quitina y los métodos a los que se ve sometida esta, determinarán el grado de pureza, la composición y el tamaño de las moléculas de quitosano (Galed *et al.*, 2005). Por este motivo, el grado de acetilación (DA, del inglés *Degree of Acetylation*), el patrón de acetilación (PA, del inglés

Pattern of Acetylation) y el peso molecular promedio (\overline{M}_w , del inglés *Average Molecular Weight*), son los parámetros imprescindibles para la caracterización de este biopolímero, la clasificación de distintos quitosanos y su posterior uso aplicado.

Los quitosanos comerciales suelen estar disponibles según diferentes grados de pureza, y rangos de peso molecular y DA. La fuente de procedencia así como la variedad de procesos de obtención de quitosano condicionan el que se produzcan quitosanos de diferente calidad y características pudiendo adecuarse en mayor o menor medida a las especificaciones farmacológicas o biomédicas. A pesar de que la preparación de quitosano a partir de quitina conlleva procesos de desmineralización y desproteínización, el polímero resultando puede contener trazas de impurezas tales como metales pesados, cenizas o proteínas. El nivel de pureza del quitosano es un factor que no solo afecta a las propiedades biológicas, sino también a su solubilidad y estabilidad. Por tanto, es fundamental obtener un quitosano de alta pureza y libre de posibles contaminantes (Szymańska *et al.*, 2015).

El grado de acetilación (DA) se define como la relación existente entre unidades de N-acetilglucosaminas (A) y unidades de N-glucosamina (D), y se expresa en tanto por ciento. En la práctica, los polímeros con un DA inferior al 40-50 % se consideran quitosanos (Domard *et al.*, 2002), y durante el proceso de desacetilación nunca se suele llegar a la desacetilación completa de la quitina, obteniéndose quitosanos no de forma muy común con hasta un 99 % de desacetilación. Este parámetro resulta fundamental para determinar la solubilidad del polímero así como sus propiedades biológicas (Roberts, 2008; Rinaudo, 2008), puesto que representa la proporción de grupos amino libre (NH_2) capaces de protonarse (NH_3^+), lo cual faculta al quitosano para interaccionar con otras moléculas cargadas negativamente, como por ejemplo las proteínas (Aranaz *et al.*, 2009).

Este parámetro se puede calcular mediante diferentes técnicas tales como potenciometría (Rusu-Balaita *et al.*, 2003), espectroscopia infrarroja (Brugnerotto *et al.*, 2001a), espectroscopia ultravioleta (Muzzarelli *et al.*, 1985) y resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN) (Rinaudo *et al.*, 1992) o de carbono (^{13}C -RMN) (Saito *et al.*, 1987; Heux *et al.*, 2000). Actualmente, ^1H -RMN se considera la técnica más sensible y precisa para calcular este parámetro (Kasaai, 2010; Rinaudo, 2006).

El patrón de acetilación (PA, del inglés *Pattern of Acetylation*) hace referencia a la distribución de las unidades de N-acetilglucosamina a lo largo del esqueleto de N-glucosamina del

polímero, y esta puede influir en la solubilidad del polímero, debido a la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares y al carácter hidrofóbico de los grupos acetilo (Rinaudo, 2006). Siguiendo una distribución estadística de Bernouilli para polímeros, los valores de PA igual a 0, 1 y 2 indican distribución perfecta en bloque, distribución aleatoria, y distribución alternada de los grupos N-acetilo a lo largo de las cadenas del polímero (Kumirska *et al.*, 2009a; Weinhold *et al.*, 2009a).

El peso molecular promedio (\overline{M}_w) se define como la media de los pesos moleculares de todas las moléculas presentes en la muestra de quitosano, y se expresa en kilo Dalton (kDa, 1 Da = 1 g / mol). Las dos formas más comunes de expresar este parámetro son el peso molecular promedio en número (\overline{M}_n) (ASTM, 2007), y el peso molecular promedio en peso (\overline{M}_w). Este último suele ser el más empleado, y ambos se definen según las siguientes ecuaciones:

$$\overline{M}_n = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i} \quad \overline{M}_w = \frac{\sum_i W_i M_i}{\sum_i W_i} = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i}$$

Donde N_i es el número de moléculas que tienen un peso molecular específico (M_i) y W_i es el peso de las moléculas que tienen un peso molecular específico. La relación entre \overline{M}_w y \overline{M}_n se denomina índice de polidispersidad (PDI, del inglés *Polydispersity Index*) e indica el grado de variación o amplitud de una campana gaussiana que representa los pesos moleculares de un polímero.

El \overline{M}_w se puede determinar mediante viscosimetría (Wang *et al.*, 1991), ultracentrifugación analítica (Errington *et al.*, 1993) o mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC, del inglés *Size Exclusion Chromatography*) (Ottøy *et al.*, 1996a). En función de la técnica empleada se obtienen valores de peso molecular promedio que pueden diferir en varios órdenes de magnitud. Por otro lado, el origen de la fuente de quitina así como el tipo de método de obtención del quitosano también pueden influir en el peso molecular del polímero (Roberts *et al.*, 1982).

Mediante viscosimetría se puede determinar el la viscosidad intrínseca $[\eta]$ y el peso molecular promedio viscoso (\overline{M}_v), el cual dependerá principalmente de la naturaleza del solvente y de la temperatura empleada. La viscosidad intrínseca es un parámetro influenciado por la concentración del polímero y hace referencia al volumen hidrodinámico que ocupan las

macromoléculas en solución, reflejo del tamaño molecular (Kasaai, 2007). En la práctica, se determina a partir de medidas de la viscosidad relativa en solución con diferentes concentraciones del polímero. Estas se realizan en un viscosímetro capilar, a una temperatura constante, y se basan en la Ley de Poiseuille, asumiendo un comportamiento newtoniano para bajas concentraciones y bajas fuerzas de cizalla (flujo laminar). La $[\eta]$ se determina a partir de las aproximaciones de *Huggins y Kraemer* (Huggins, 1942; Wang *et al.*, 1991).

Por otro lado, mediante SEC se determina directamente el \overline{M}_w absoluto a través de sistemas de detección de *Multi-Angle Laser-Light Scattering* sin necesidad de calibración. Mediante esta técnica se determina el peso molecular promedio aparente ($\overline{M}_{w,app}$) y el radio de giro de las moléculas $\langle Rg \rangle$ empleando el formalismo de Deybe-Zimm (Wyatt, 1992).

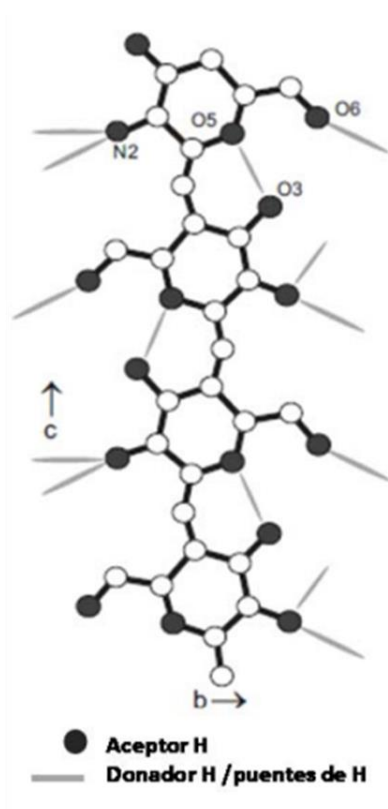


Figura I.2. Modelo de la estructura de un oligómeros de quitosano totalmente desacetilado. Se representa una hélice extendida muy estable debido a la formación de enlaces de hidrógeno intramoleculares (entre los oxígenos O3-O5, O3-O6,) e intermoleculares (N2-O6). Fuente: Weinhold *et al.*, 2009a).

La estructura primaria del quitosano viene determinada por la secuencia de unidades A y D a lo largo de la cadena del polímero, y la estructura secundaria se establece en solución a través de interacciones intra- e intermoleculares con las moléculas del solvente. Como consecuencia, el

quitosano en estado sólido presenta una estructura similar a una doble hélice rígida, mientras que en solución adopta una estructura de hélice flexible (Colfen *et al.*, 2001). Estando en solución por tanto, presenta una estructura cristalina, ya que la hélice sufre una torsión debido a la presencia de los aniones del solvente, mostrando una hélice relajada (Weinhold *et al.*, 2009a). La estructura terciaria se observa cuando la doble hélice extendida cambia a una estructura en forma de horquilla, siendo ambas estructuras muy estables y no fácilmente convertibles la una en la otra (Sakajiri *et al.*, 2006). Por último, la asociación de muchas cadenas poliméricas mediante interacciones intermoleculares conduce a la estructura cuaternaria.

1.2. Solubilidad

La solubilidad del quitosano no solo se encuentra influenciada por el tamaño molecular de las cadenas o por la densidad de carga de grupos amino (Anthonsen *et al.*, 1993), sino también por otra serie de factores como el pH y la fuerza iónica de la solución, el tipo de solvente, la temperatura y la concentración de ácido empleado (Aranaz *et al.*, 2009) o el patrón de acetilación (Rinaudo, 2006). Tras el proceso de desacetilación de la quitina, como consecuencia de la hidrólisis del grupo N-acetilo, se forma una amina primaria (NH_2) en las unidades desacetiladas, la cual se protona (NH_3^+), aumentando su solubilidad en medios ácidos diluidos y forma sales a pH superiores a 6,5 ya que el pK_a del grupo amino en el quitosano es de $\sim 6,5$ (Pillai *et al.*, 2009; Tømmerraas *et al.*, 2001; Anthonsen *et al.*, 1995).

Los grupos más reactivos del quitosano son los grupos hidroxilo y el grupo amino, los cuales, junto con la proporción de monómeros acetilados, le confieren al quitosano la naturaleza anfifílica. El balance entre las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas como consecuencia de la proporción entre monómeros acetilados y desacetilados será responsable de su solubilidad (Schatz *et al.*, 2003a). Se establece un modelo de comportamiento para el quitosano en solución en función del DA del polímero (Sorlier *et al.*, 2001; Sorlier *et al.*, 2002; Schatz *et al.*, 2003b), que se detalla a continuación:

- Polímeros con DA inferior a 20 %: el quitosano presenta la mayor densidad de carga estructural con una distancia media de 5-6 Å entre los grupos ionizables distribuidos a lo largo de la cadena. En esta región, el quitosano se comporta como un polielectrolito debido a larga distancia de las interacciones intra- e intermoleculares. Estas interacciones son las responsables de la expansión de las cadenas, de la alta

solubilidad y de la condensación iónica. Aunque la expansión y conformación de las cadenas también dependen de la concentración de sales del medio.

- Polímeros con DA 20-50 %: en este caso existe un balance entre las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas. Los parámetros fisicoquímicos como la viscosidad intrínseca, el radio de giro de las moléculas o el incremento del índice de refracción permanecen más o menos constantes.
- Polímeros con DA superior a 50 %: el quitosano presenta menor densidad de carga y la distancia entre los grupos ionizables es mayor, por lo que las interacciones electrostáticas que tienen lugar son a corta distancia. Debido a la mayor presencia de grupos acetilo, predominan las interacciones hidrofóbicas, las cuales inducen asociaciones de cadenas con altos valores de radio de giro.

Respecto a la relación del tipo de interacciones que se dan entre la cadena polimérica y los iones de la disolución, parece ser que cuanto mayor es el número de interacciones intermoleculares, existirá un mayor valor de la viscosidad intrínseca. Por otro lado, cuando se producen interacciones intramoleculares, se pueden dar fenómenos de autoagregación, lo cual reduciría la viscosidad intrínseca incluso a altas concentraciones (Hu *et al.*, 2007).

1.3. Modificación del peso molecular promedio

Son ampliamente conocidas las numerosas aplicaciones funcionales que presenta el quitosano (Younes *et al.*, 2015). Sin embargo, su escasa solubilidad a pH superiores a 6 y su elevada viscosidad termina generando una baja absorción en el organismo incluso a bajas concentraciones, limitando el empleo de este polímero en algunas aplicaciones.

En la práctica existen numerosos métodos que permiten disminuir el peso molecular del quitosano, los cuales se dividen en físicos, químicos o enzimáticos (Aranaz *et al.*, 2014). Los métodos físicos, basados en el empleo de irradiación con ultravioleta (Yue *et al.*, 2009), irradiación gamma (Ocloo *et al.*, 2011) o con ultrasonido (Kasaai *et al.*, 2008), son tratamientos con bajo rendimiento y poco utilizados en el área biomédica.

Por otro lado, los métodos químicos, basados en la utilización de HCl, H₂O₂ o HNO₂ (Kumar *et al.*, 2004) son hidrólisis ampliamente usadas para obtener quitosanos de bajo peso molecular (LMWC, del inglés *Low Molecular Weight Chitosan*) y procesos muy económicos. La hidrólisis más frecuentemente empleada implica la utilización de HNO₂ (Tømmerraas *et al.*, 2001), y

conlleva una reacción en condiciones homogéneas en la cual, la hidrólisis se produce al azar y el ácido se consume en relación estequiométrica a la rotura del enlace glicosídico (Allan *et al.*, 1995a; 1995b). Otro tipo de hidrólisis con H_2O_2 (Tian *et al.*, 2010) o HNO_2 (Ngo *et al.*, 2011a) se han propuesto para obtener quitosanos de menor peso molecular que sean hidrosolubles y permitan el estudio de determinadas propiedades en cultivos celulares. Estos métodos además presentan la ventaja de ser procesos fáciles, eficaces y no generar impurezas.

Los métodos de hidrólisis enzimática se caracterizan por el uso de enzimas, que suelen ser caras, y condiciones especiales de reacción controladas durante todo el proceso (Aranaz *et al.*, 2014). Tanto la quitina como el quitosano pueden ser degradados por un amplio espectro de enzimas, destacando las enzimas específicas con actividad quitosanólítica (Hsiao *et al.*, 2008; Kuroiwa *et al.*, 2008). La especificidad de estas enzimas permite hidrolizar quitosanos parcialmente acetilados dando lugar a heterooligosacáridos y/o quitosanos LMWC, los cuales presentan mayor solubilidad que el polímero original (Xia *et al.*, 2011). Alternativamente se ha estudiado también el uso de enzimas no específicas que incluyen hemicelulasas, lipasas, pectinasas, proteasas, lisozimas y celulasas (Abd-Elmohdy *et al.*, 2010; Cabrera *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2004).

1.4. Modificación del grado de acetilación

En la práctica, la reacetilación del quitosano es una alternativa para producir polímeros con una distribución de unidades acetiladas más homogénea y aleatoria en comparación con el proceso heterogéneo de desacetilación (Aiba, 1992). Resulta útil para preparar quitosanos de peso molecular similar y con diferentes DA (Knaul *et al.*, 1998; Maghami *et al.*, 1988) e incluso para obtener quitosanos solubles de bajo peso molecular con un mayor DA (Dal Pozzo *et al.*, 2000)

La mayor presencia de monómeros acetilados en el esqueleto de N-glucosamina puede afectar a la degradabilidad enzimática del polímero (Shigemasa *et al.*, 1994), por lo que en ocasiones resulta de interés reacetilar el polímero para ver cómo se ven afectados los procesos de despolimerización enzimática. Esta reacción se lleva a cabo mediante la adición de anhídrido acético a la solución de quitosano, lo cual implica el ataque nucleofílico de un grupo amino primario no protonado de la N-glucosamina sobre el grupo carboxilo del anhídrido acético (Lavertu *et al.*, 2012).

1.5. Biocompatibilidad

La biocompatibilidad se define como la capacidad de un material para no perjudicar ni degradar el medio biológico en el cual es utilizado. Un material o compuesto biocompatible es aquel que no produce ningún efecto tóxico ni inflamatorio en un sistema biológico. Existen normas de calidad ISO de obligado cumplimiento para testar la toxicidad y biocompatibilidad *in vitro* de un compuesto. Una herramienta fundamental para evaluar esta toxicidad y proporcionar el conocimiento de los mecanismos de inducción de toxicidad de un compuesto son los cultivos *in vitro* (Hirano *et al.*, 1990; Rodrigues *et al.*, 2012).

El quitosano es considerado como un polímero relativamente no tóxico y biocompatible (Thanou *et al.*, 2001). En vertebrados, el quitosano puede ser biodegradado por lisozimas, proteasas, o por bacterias del tracto gastrointestinal, dando lugar a oligómeros fácilmente reabsorbibles por el organismo (Kean *et al.*, 2010). Este polímero está aprobado como excipiente de productos farmacéuticos, desde el 2002 bajo la forma de hidrocloreto de quitosano (Farmacopea Europea, 2002) y desde el 2011 como quitosano (Farmacopea Europea, 2011).

Tanto el DA como M_w del polímero son las principales características relacionadas con la viabilidad celular, sin embargo existe disparidad de resultados en función de las características del quitosano y de la línea celular empleada. El balance existente entre las cargas positivas, el peso molecular y las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas que se produzcan, tendrá efectos sobre la interacción del polímero con las células y el microambiente. Además, la vía de administración del polímero, el tiempo de contacto y la concentración, determinarán la absorción de este y sus posibles efectos en el organismo (Kean *et al.*, 2010).

2. QUITOOLIGOSACÁRIDOS

Los quitoooligosacáridos (COS) proceden de la hidrólisis del quitosano y se definen como co-oligómeros lineales formados por unidades de 2-acetamido-2-deoxi- β -D-glucosa y 2-amino-2-deoxi- β -D-glucosa unidas mediante enlaces glicosídicos β (1-4). Estos productos son hidrosolubles, y siguen manteniendo las propiedades biodegradables y biocompatibles de los quitosanos (Kurita *et al.*, 1998), cualidades que facilitan su utilización en áreas como la biomedicina (Zou *et al.*, 2016), la cosmética (Ravi Kumar, 2000), la alimentación o la agricultura (Aranaz *et al.*, 2014), entre otras. La bioactividad de estos productos a menudo se ha

determinado en mezclas heterogéneas de oligómeros pobremente caracterizados, y este hecho dificulta la comparación de resultados así como la extracción de relaciones claras entre las características fisicoquímicas de las muestras y sus propiedades biológicas. Por este motivo, la obtención de COS bien definidos estructural y fisicoquímicamente es un área que ha recobrado especial interés en los últimos años.

2.1. Métodos de obtención y separación de COS

Los COS son productos de degradación del quitosano que se pueden obtener mediante métodos de diferente naturaleza (Jung *et al.*, 2014). La hidrólisis del enlace glicosídico del quitosano mediante diferentes métodos, da lugar a COS de diferentes longitudes (DP), y diferente composición de unidades acetiladas. Durante la última década han cobrado interés las investigaciones sobre cómo preparar COS, entre las cuales se pueden encontrar la hidrólisis ácida (Tsao *et al.*, 2011), hidrólisis enzimática (Wu, 2011), degradación por ultrasonido (Liu *et al.*, 2006) o degradación por oxidación (Xia Wu *et al.*, 2013). El objetivo general es disminuir drásticamente el M_w del polímero original mediante la rotura del enlace O-glicosídico entre los anillos de piranosa.

Los métodos físicos conllevan el empleo microondas (Xing *et al.*, 2005), ultrasonidos (Wu *et al.*, 2008) o irradiación gamma (Yoksan *et al.*, 2004) entre otros. Los procesos químicos implican la utilización de ácido (Domard *et al.*, 1992) o de H_2O_2 (Lin *et al.*, 2009). Respecto a los métodos químicos, la hidrólisis ácida del enlace glicosídico es la mejor estudiada (Einbu *et al.*, 2007; Tømmerraas *et al.*, 2001; Vårum *et al.*, 2001).

Inicialmente, se utilizaba HCl concentrado para degradar polímeros de quitosano casi completamente desacetilados hasta la obtención de COS (Domard *et al.*, 1992). Posteriormente, se demostró la especificidad de la hidrólisis ácida empleando HCl en quitosanos parcialmente acetilados, ya que los enlaces glicosídicos entre dos unidades acetiladas (A-A) o entre una N-acetilglucosamina y una N-glucosamina (A-D) se hidrolizaban con una velocidad dos o tres órdenes de magnitud más rápido que los enlaces glicosídicos entre dos unidades desacetiladas (D-D) o una N-glucosamina y una N-acetilglucosamina (D-A) (Vårum *et al.*, 2001).

En la producción de COS a escala industrial, la hidrólisis ácida se utiliza con mayor frecuencia que otros métodos, ya que mediante este proceso se pueden obtener COS bioactivos de bajo

DP (Jeon *et al.*, 2000). Sin embargo este tipo de procesos químicos presenta desventajas en términos de rendimientos de producción bajos y riesgo de contaminación medioambiental (Zou *et al.*, 2016), aunque en general, la producción de COS es un proceso con bajos rendimientos.

Por otro lado, los métodos de producción enzimáticos han generado gran interés en los últimos años ya que minimizan la posibilidad de generar productos tóxicos. El quitosano puede ser hidrolizado por numerosas enzimas inespecíficas tales como celulasa (Lin *et al.*, 2009) o lisozima (Mengíbar *et al.*, 2011), y por enzimas específicas como quitinasa o quitosanasa (Song *et al.*, 2014; Mengíbar *et al.*, 2011), las cuales presentan actividad quitosanólítica. Estas enzimas se suelen aislar de bacterias o de hongos. Frecuentemente la fuente de procedencia de las quitosanasas suele ser bacteriana, ya que se ha observado que quitosanasas de otras fuentes suelen tener un escaso rendimiento de producción de COS (Zou *et al.*, 2016). Por lo general, la principal fuente de obtención es a partir de las especies bacterianas *Bacillus sp* y *Streptomyces sp*. Aunque estas quitosanasas producen buenos rendimientos de producción de COS, su elevado coste restringe su uso a gran escala (Zhang *et al.*, 1999).

Una de las estrategias para disminuir los costes elevados que conlleva el uso de enzimas en este tipo de procesos, son los sistemas de producción de COS en continuo, empleando un reactor en el cual se inmoviliza la enzima sobre un soporte (Song *et al.*, 2014). Tecnológicamente presenta más ventajas ya que la enzima se puede reutilizar, disminuyendo el coste del proceso, y al ser una reacción en continuo la calidad del producto final puede ser más fácilmente controlada. Este tipo de producción se está anteponiendo al que se utilizaba inicialmente basado en la producción *en batch* o en lote (Izume *et al.*, 1987). Sin embargo, la enzima inmovilizada presenta menos afinidad por el sustrato que la enzima libre, y por ello sigue siendo un proceso ineficiente (Zou *et al.*, 2016).

Las enzimas con actividad quitosanólítica hidrolizan más eficientemente el enlace β (1-4) glicosídico en quitosanos que en quitinas, ya que la solubilidad del quitosano es mayor. El quitosano se suele solubilizar en ácido acético, láctico o cítrico para facilitar la acción enzimática ya que estas enzimas prefieren un sustrato homogéneamente disuelto, favoreciéndose así la hidrólisis más rápidamente (Jung *et al.*, 2014).

Tras la reacción de hidrólisis, se obtiene una mezcla heterogénea de oligosacáridos con una amplia distribución de grados de polimerización y con presencia de sales debido al solvente

utilizado para llevar a cabo la reacción. La estrategia más ampliamente utilizada para la separación de la mezcla de oligómeros está basada en la utilización de un sistema de membranas de ultrafiltración (UF). Mediante este tipo de sistemas se puede controlar el tamaño de corte molecular mediante el uso de membranas de separación de distinto rango de tamaños de poro, el cual determinará el tamaño molecular de los COS, lo que permite obtener fracciones de COS de menor distribución de peso molecular. Por otro lado, este tipo de separación evita llevar a cabo un proceso en continuo debido a la presión transmembrana ocasionada por las cadenas de polisacárido que no se han hidrolizado (Zou *et al.*, 2016). Con este sistema se producen COS de manera eficaz, controlando la distribución de pesos moleculares (Kim *et al.*, 2005). En último término, es necesario dializar las fracciones de oligómeros separadas con el objetivo de obtener productos de mayor pureza, lo cual conlleva un incremento del coste del proceso.

2.2. Despolimerización del quitosano con quitosanasas

Las quitosanasas son glicosil hidrolasas que catalizan la hidrólisis de los enlaces O-glicosídicos de quitosanos parcialmente acetilados de forma endo-hidrolítica. En la naturaleza, estas enzimas son sintetizadas por bacterias, hongos y plantas (Izume *et al.*, 1992). Se clasifican en familias en base a la similitud de su secuencia pero presentan una gran multiplicidad en la especificidad de sustrato que sí depende del microorganismo de procedencia (Chiang *et al.*, 2003). Generalmente, la principal fuente de obtención es a partir de las especies bacterianas *Bacillus sp* y *Streptomyces sp*.

Dentro de la molécula de quitosano se distinguen los siguientes tipos de enlaces: entre dos unidades acetiladas (A-A), entre dos unidades desacetiladas (D-D), y entre una unidad acetilada y otra desacetilada o viceversa (A-D o D-A). En función del tipo de enlace por el que las quitosanasas tengan especificidad, estas se clasifican en tres subclases. Las quitosanasas de la subclase I hidrolizan enlaces tipo A-D y D-D, las de la subclase II solo hidrolizan enlaces D-D, y las de la subclase III enlaces D-A y D-D. Como mínimo se necesita un monómero de N-glucosamina en el enlace glicosídico para que dichas enzimas sean activas. Por lo tanto ninguna quitosanasa hidroliza enlaces tipo A-A en quitosanos parcialmente acetilados. La selectividad de las quitosanasas por el tipo de enlace del sustrato es debida al reconocimiento de la rigidez del enlace por parte de las diferentes subclases de quitosanasas (Thadathil, *et al.*, 2014). Esta especificidad respecto a la hidrólisis de diferentes enlaces O-glicosídicos en quitosanos parcialmente acetilados se determina por la identidad de los extremos reductores y

no reductores resultantes de la hidrólisis así como por el DA (Kim *et al.*, 2005). La diferencia entre quitinasa y quitosanasa es estrecha, ambas pueden hidrolizar quitosanos de diferentes grados de acetilación, pero la quitosanasa suele preferir sustratos muy desacetilados y la quitinasa sustratos muy acetilados (Somashekar *et al.*, 1996).

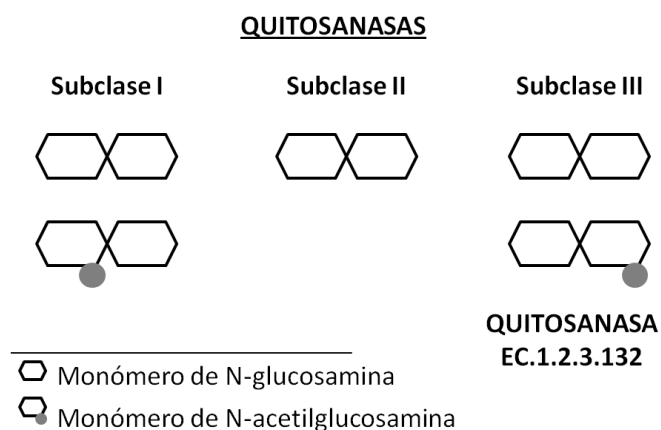


Figura I.3. Clasificación de las quitosanasas. Se representan los enlaces que hidroliza cada subclase.

Las quitosanasas se agrupan en familias de glicosil hidrolasas (GH) en función de la secuencia de aminoácidos. Entre estas familias, la GH-46 recoge las quitosanasas procedentes de las especies bacterianas *Bacillus* y *Streptomyces*, las cuales han sido extensamente estudiadas en términos de mecanismos de acción enzimática y estructura proteica (Thadathil, *et al.*, 2014). La familia GH-75 es la otra familia mejor estudiada la cual incluye quitosanasas de origen fúngico (Wang *et al.*, 2008).

Las quitosanasas pueden alojar al menos seis monómeros desacetilados en el dominio de unión a sustrato y la hidrólisis ocurre en el punto medio de este (Fukamizo *et al.*, 1995; Vårum *et al.*, 1996). Dichas enzimas requieren tres o más unidades de N-glucosamina o N-acetilglucosamina para desarrollar su actividad. La quitosanasa I parece ser un derivado de la quitosanasa II y ambas producen específicamente la forma β anomérica de los oligómeros, es decir, presentan retención anomérica (Fukamizo *et al.*, 1995), y la especificidad anomérica depende de la estructura del sitio catalítico. Tienen un peso molecular aproximado de 34 kDa determinado por SDS-PAGE y un punto isoeléctrico de 9,7. Su pH óptimo es de 5,7 y la temperatura óptima de actuación se encuentra entre 30°C y 60°C (Tanabe *et al.*, 2003).

Existen dos aminoácidos esenciales en su estructura para que tenga lugar la acción catalítica, Glu-22 y Asp-40, que actúan como donador y aceptor de protones. En base a la configuración

del protón del carbono anomérico del extremo reductor resultante de la hidrólisis, existen dos hipótesis acerca del mecanismo de catálisis de quitosanasas. Un mecanismo en dos pasos en que se da un doble desplazamiento de los aminoácidos implicados, donde uno actúa como nucleófilo y otro como un ácido/base general. El otro mecanismo se da en una sola etapa con un desplazamiento individual, con ayuda de un ácido o base general (Thadathil, *et al.*, 2014). El mecanismo más generalizado asume que la reacción quitosanólítica tiene lugar a través de la donación de un protón del grupo carboxílico de Glu-22 con la activación de una molécula de agua, produciéndose así el ataque del C-1 del sustrato a través de un grupo carboxilo de Asp-40 (Fukamizo *et al.*, 2000).

Streptomyces griseus es un microorganismo capaz de secretar quitosanasas cuando crece en presencia de quitosano como única fuente de carbohidratos. Según la especificidad del tipo de enlace glicosídico que hidrolizan, se clasifica en la subclase III de quitosanasas, ya que pueden escindir tanto enlaces D-A como D-D en quitosanos parcialmente acetilados produciendo heterooligosacáridos con extremos reductores ocupados por unidades de N-glucosamina, y no actúan sobre polímeros de quitina (Ohtakara, 1988).

2.3. Características fisicoquímicas de los COS

Al igual que los quitosanos, los parámetros fisicoquímicos principales que los definen, son el grado de acetilación (DA), el tamaño molecular de las cadenas que los conforman o grado de polimerización (DP, del inglés *Degree of Polymerization*), y el patrón de distribución de las unidades acetiladas (PA). Asimismo, las propiedades biológicas de los COS dependerán del DA, del DP, y del PA, el cual no se puede controlar cuando los COS se producen mediante hidrólisis química del quitosano (Hamer *et al.*, 2015).

Al contrario que el quitosano, los COS presentan una elevada solubilidad y muy baja viscosidad en condiciones fisiológicas, lo cual es debido principalmente a la menor longitud de las cadenas y a la protonación de los grupos amino libre de las unidades desacetiladas en solución. (Zou *et al.*, 2016). Esta cualidad amplía el campo de aplicaciones que ya existía para el quitosano, y le confiere una ventaja para numerosas aplicaciones biomédicas.

Por otro lado, al tratarse de moléculas de muy bajo peso molecular, existe la posibilidad de estudiar su composición intramolecular mediante espectrometría de masas (Kim *et al.*, 2013), ampliando el conocimiento aportado por otras técnicas como ¹H-RMN. Mediante esta técnica,

además de la composición intramolecular, se puede estudiar la distribución de pesos moleculares (DP) de una mezcla de COS y su abundancia relativa en la muestra, lo cual es fundamental a la hora de entender cómo se comporta una mezcla de COS en un sistema biológico.

Al igual que con el quitosano, mediante ^1H -RMN se estudia la estructura del COS y se puede determinar su DA. En este caso, al tener moléculas de muy bajo peso molecular, se puede estudiar más detalladamente la estructura, puesto que se obtienen espectros con mayor resolución (Kasaai, 2010), así como los extremos reductores resultantes de la degradación del quitosano y cualquier tipo de subproducto que se haya podido generar durante el proceso de obtención de los COS. Por lo tanto, la caracterización, cuantificación e identificación de los COS resulta fundamental para comprender mejor la relación entre los parámetros fisicoquímicos de las moléculas de quitosano y sus actividades biológicas (Kumirska *et al.*, 2009a).

3. PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS QUITOOLIGOSACÁRIDOS

Los COS son totalmente hidrosolubles y presentan una viscosidad muy baja, por ello se pueden utilizar en un amplio espectro de aplicaciones que engloban desde la biomedicina, la industria alimentaria y cosmética o la agricultura entre otras (Ngo *et al.*, 2015). Todo ello es posible también gracias a que son oligómeros totalmente biocompatibles y biodegradables, (Muzzarelli, 2009; Muzzarelli *et al.*, 1999), ya que mantienen las ventajas que presentan los quitosanos. Dentro del área biomédica, el estudio de los COS ha recobrado especial interés sobre todo debido a sus efectos biológicos como antioxidantes, como antiinflamatorios, anticoagulantes, anticancerígenos, antibacterianos o antialérgicos entre otros (Zou *et al.*, 2016; Ngo *et al.*, 2015; Dash *et al.*, 2011; Prashanth *et al.*, 2005).

Las moléculas de quitosano tienen tres tipos de grupos funcionales reactivos, como ya se ha comentado con anterioridad. Un grupo amino libre, un grupo N-acetilo, grupos hidroxilos primarios en los carbonos C-2 y C-3 e hidroxilo secundario en el C-6 del anillo de piranosa. El contenido en grupos amino parece ser el principal factor contribuyente a las diferencias observadas entre la estructura del polímero y sus propiedades fisicoquímicas. Además la distribución aleatoria de los grupos acetilo, así como el menor impedimento estérico, hace que se generen interacciones electroestáticas intra- e intermoleculares fácilmente. Por otro lado, la longitud de las cadenas de quitosano y su distribución es otro de los principales factores que contribuirá directamente a las funciones biológicas del polímero (Zhang *et al.*, 2010). Mediante

la variación de las propiedades fisicoquímicas de los COS, se pueden obtener muestras diferentes que pueden proporcionar mayor información sobre sus propiedades biológicas, ampliando nuevas aplicaciones terapéuticas para la prevención o el tratamiento de enfermedades crónicas (Ngo *et al.*, 2015).

Debido a su bajo M_w , estos COS pueden emplearse de forma muy eficiente como agentes antimicrobianos frente a un amplio espectro de especies bacterianas (Lin *et al.*, 2009), como agentes antioxidantes (Ngo *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2013; Niu *et al.*, 2013; Ngo *et al.*, 2011b) y agentes antiinflamatorios (Chung *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2009), lo cual le confiere a los COS grandes posibilidades para aplicaciones en el área de la biomedicina.

3.1. Actividad antimicrobiana

Se ha reconocido el gran potencial que presentan los COS como agentes antimicrobianos naturales frente a un amplio espectro de microorganismos, aunque su efecto difiere en función de la fuente de procedencia del quitosano, de sus propiedades, del pH del medio y sobre todo, en función del método experimental utilizado y el microorganismo estudiado (Zou *et al.*, 2016; Chang *et al.*, 2015). Es bien conocido el potente efecto antimicrobiano frente a un amplio espectro de microorganismos desde 1979 (Allan *et al.*, 1979) tanto por parte de los quitosanos como por parte de los COS. Desde entonces, numerosos estudios han reportado los efectos antimicrobianos del quitosano y de los COS frente a distintos tipos de bacterias (Younes *et al.*, 2014; Chung *et al.*, 2008; 2004; Tsai, 2002) y hongos (Hirano *et al.*, 1989). En definitiva, el efecto antimicrobiano de los COS se verá afectado por una amplia serie de factores físicos, químicos y biológicos, que incluyen la concentración de COS, el M_w y DP, el DA, el PA, el pH del medio de cultivo, la temperatura, salinidad, presencia de cationes divalentes y la fase de crecimiento del microorganismo (Chang *et al.*, 2015; Chung *et al.*, 2004, Park *et al.*, 2004; Gerasimenko *et al.*, 2004).

3.1.1. Mecanismo de acción antimicrobiano

Existen varias hipótesis sobre el mecanismo a través del cual los COS ejercen su actividad antibacteriana. Entre ellos, el más generalizado está basado en la interacción electrostática de las moléculas de COS con los componentes predominantemente aniónicos de la superficie bacteriana (Kong *et al.*, 2010). Los COS tienen capacidad para alterar la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, impidiendo el correcto flujo de nutrientes y conduciendo a la

bacteria a la muerte (Rabea *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2001; Sudarshan *et al.*, 1992). Asimismo, debido a la capacidad quelante por parte de moléculas de quitosano, también se puede producir un secuestro de nutrientes esenciales, que conducen a la muerte celular (Cuero *et al.*, 2009). Se ha comprobado que los grupos amino libres de las moléculas de COS están directamente implicados en la actividad antibacteriana (Chen *et al.*, 2002). Por otro lado, se ha propuesto otro mecanismo de acción para los COS el cual está basado en la penetración de las moléculas de COS al medio intracelular, donde reaccionaría con moléculas cargadas negativamente tales como el ADN o el ARN con el consiguiente bloqueo del proceso de transcripción y por tanto la muerte celular (Kim *et al.*, 2003).

Fernandes *et al.*, (2008) describieron que el efecto antimicrobiano de las moléculas de quitosano dependía estrechamente de la naturaleza de la cepa bacteriana (Gram positiva o Gram negativa), encontrándose mejor efecto con moléculas de alto M_w en bacterias Gram negativas que en bacterias Gram positivas, para las que moléculas de menor M_w tenían mayor efecto. En cualquier caso, la naturaleza catiónica de los COS debida al grupo amino libre del C-2 del anillo de N-glucosamina, es la responsable de la interacción entre los COS y la superficie celular, ya que se produce una interacción con las moléculas cargadas negativamente, como es el caso de los grupos carboxilos de sus macromoléculas (Kong *et al.*, 2010). De este hecho se puede inferir que tanto el DA como el DP de los COS influirán directamente en la inhibición del crecimiento bacteriano, y que conforme disminuya el DA de los COS se incrementará el efecto inhibidor de los COS (Tsai *et al.*, 2002), aunque existe disparidad de resultados respecto a cuál es el intervalo de DA más efectivo.

Debido a la diferente morfología de la superficie externa celular, el posible mecanismo de acción antibacteriano planteado puede presentar diferencias. La superficie celular es una estructura químicamente heterogénea y compleja, por lo que no se puede considerar como una simple superficie esférica. Algunas bacterias presentan flagelos y pueden presentar diversidad de moléculas en la superficie celular, como LPS, ácido micólicos, lipoteicoicos, diversidad de proteínas y polisacáridos (Hancock, 1991). Estos componentes están involucrados en las interacciones que tengan lugar con otras moléculas del microambiente o con otras bacterias. Por otro lado, la hidrofobicidad de la superficie bacteriana también está involucrada en estas interacciones, participando estrechamente en fenómenos de adhesión o floculación (Stranda *et al.*, 2002).

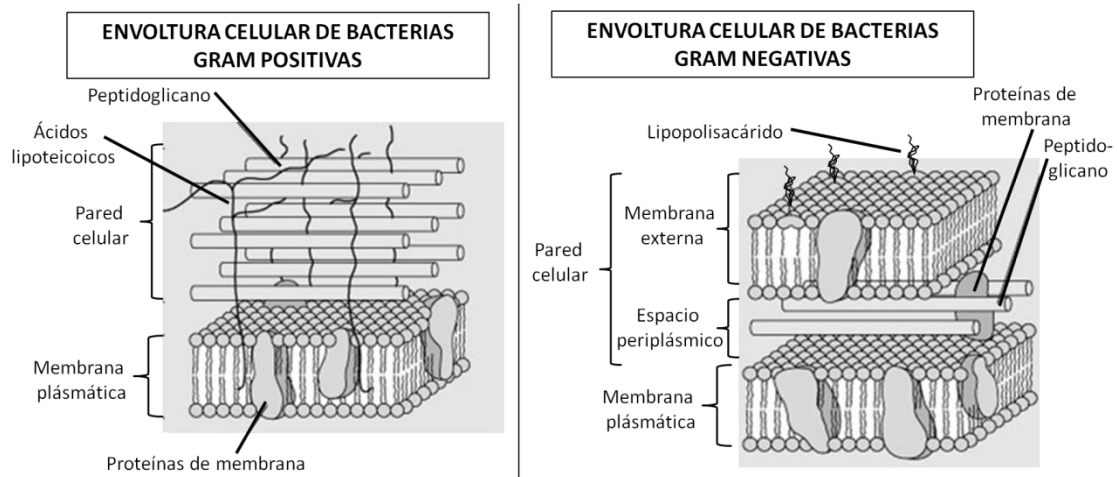


Figura I.4. Esquema de la envoltura celular de bacterias gram positivas y gram negativas.

Bacterias Gram negativas

Este tipo de bacterias presentan dos membranas lipídicas entre las que se localiza una delgada pared celular de peptidoglicano. Al ser esta capa tan delgada, no retiene el colorante durante la tinción de Gram (Gram, 1884). En este grupo se encuentran bacterias patógenas tales como *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella sp*, *Legionella pneumophila* o *Escherichia coli*, entre otras, responsables de numerosas enfermedades del tracto respiratorio, gastrointestinal o enfermedades nosocomiales.

La envoltura celular está compuesta por una membrana lipídica (membrana citoplasmática), una pared de peptidoglicano que rodea esta membrana, y otra membrana lipídica externa que engloba estas dos (Ghuysen, 1971). Entre estas dos membranas se encuentra el espacio periplásmico en el cual se hayan numerosas enzimas importantes para la nutrición celular. La membrana externa contiene porinas o canales proteicos implicados en el transporte de sustancias, y lipopolisacáridos (LPS), el cual le confiere carácter hidrofílico a la membrana externa. El LPS está compuesto por tres regiones: el polisacárido O (antígeno O), una estructura polisacáridica central o región *core*, y el lípido A (endotoxina). El lípido A y la región *core* contienen grupos aniónicos, como fosfatos y carboxilos, los cuales, junto con los grupos aniónicos de proteínas de la membrana externa, se cree que son responsables de la interacción con las moléculas de quitosano (Helander *et al.*, 2001). La membrana externa también supone una barrera para la entrada de macromoléculas hacia el espacio intracelular, lo cual le confiere a este tipo de bacterias resistencia a antibióticos. Por ello, vencer esa barrera o desestabilizarla, es un requisito indispensable para cualquier compuesto con potencial efecto antibacteriano.

Bacterias Gram positivas

Este tipo de bacterias presenta una envoltura celular compuesta por la membrana plasmática rodeada por una gruesa pared de peptidoglicano, la cual se une a la membrana mediante ácido lipoteicoico (Ghuysen, 1971). La gruesa capa de peptidoglicano le confiere a este tipo de bacterias una gran resistencia, y es la responsable de atrapar el colorante de la tinción Gram. En este grupo se incluyen tanto bacterias móviles como inmóviles, tales como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lysteria*, *Lactobacillus* o *Mycoplasma*, entre otras, alguna de ellas responsable de importantes infecciones alimentarias.

El peptidoglicano, compuesto principalmente por N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico unidos por enlaces glicosídicos β (1-4), y los ácidos lipoteicoicos sirven como agentes quelantes y de sistema de adherencia (Madigan et al., 2005). Los grupos aniónicos del glicerol fosfato del ácido lipoteicoico son también responsables de mantener la estabilidad estructural de la pared celular. Este ácido lipoteicoico también es responsable de mantener determinadas enzimas unidas a la membrana plasmática (Kong et al., 2010).

A pesar de las diferencias estructurales entre bacterias Gram negativas y Gram positivas, el efecto antimicrobiano de cualquier compuesto comienza a partir de interacciones con moléculas de la superficie celular. En el caso de las bacterias Gram positivas, estas interacciones tienen lugar a través de grupos aniónicos del ácido teicoico, los cuales reaccionarán con las moléculas de quitosano, desestabilizando la membrana plasmática (Raafat et al., 2008). En el caso de las bacterias Gram negativas, las moléculas de quitosano reaccionarían con los grupos aniónicos del LPS y con las proteínas de la membrana externa. Si el pH está por encima de pK_a del quitosano, se producirá un efecto quelante por parte del polímero, atrapando iones esenciales (Mg^{2+} y Ca^{2+}) y perturbando el tráfico de nutrientes a través de la membrana externa. Las interacciones entre los grupos catiónicos y los lípidos cargados negativamente pueden ocurrir de varias formas (Ostro, 1983; Seki et al., 1984):

- Unión superficial debida a la atracción electrostática de cargas opuestas. Este tipo de interacciones se desestabilizan por el aumento de la fuerza iónica. Además, provoca un bajo impacto en la temperatura de transición de fase de los lípidos y la alteración de la permeabilidad de la membrana.

- Interacciones electrostáticas entre cargas opuestas y penetración del polímero en la pared celular, causando expansión, disminución de la temperatura de transición de fase de los lípidos y alteración de la permeabilidad de la membrana.
- Penetración y disrupción del polímero en la membrana plasmática, eliminando la capacidad de transición de fase de los lípidos. Se pueden producir micelas o agregados entre el polímero y los lípidos.

En relación a estas interacciones es importante considerar como se encuentran los grupos catiónicos cuando el quitosano se encuentra disuelto. En solución, las moléculas de quitosano presentan una conformación extendida, la cual favorece la interacción entre sus grupos funcionales de manera considerable (Phaechamud, 2008). Por ello en dicho estado, el polímero está más disponible para interactuar con la superficie celular bacteriana, inhibiendo de manera más eficiente el crecimiento bacteriano, en comparación con sistemas complejos como films o hidrogeles (Xie *et al.*, 2007, Chung *et al.*, 2005). A todo ello, habría que sumarle las características fisicoquímicas de las moléculas de quitosano y los factores ambientales que pueden interferir en que se produzca la interacción (Kong *et al.*, 2010). En este contexto, el pH del medio influirá enormemente en la conformación de las moléculas de quitosano así como en su solubilidad, llegando incluso a formar agregados en el caso de que el pH aumente por encima del pK_a del quitosano.

Todo lo comentado conduce a que el mecanismo de acción antibacteriano de las moléculas de quitosano no es un mecanismo simple, y todo apunta a la sucesión de varios eventos moleculares no selectivos, simultáneos y consecutivos que conducirían a la muerte celular, siendo muy poco probable la interacción con una única molécula diana (Kong *et al.*, 2010).

3.2. Actividad antioxidante

La acumulación de radicales libres en el organismo provoca efectos negativos en las biomoléculas celulares, lo cual puede conllevar al desarrollo de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo. El sistema fisiológico de defensa antioxidante está compuesto por estructuras de naturaleza enzimática como: superóxido dismutasa, catalasa, glutathion peroxidasa, los cuales neutralizan los radicales libres y reparan el daño provocado por ellas. Por otro lado están los compuestos de naturaleza no enzimática como: vitamina E y C, β -caroteno, glutathion reducido, albúmina, compuestos fenólicos y metales de transición como Se, Cu y Zn, entre otros (Halliwell *et al.*, 1988). También, debido al envejecimiento natural, al

ritmo de vida y dieta actual, al desarrollo de enfermedades multifactoriales relacionadas con el estrés oxidativo en las que se pueden incluir enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas entre otras, los sistemas antioxidantes naturales y endógenos pueden no llegar a neutralizar completamente este exceso de radicales libres reactivos (Valko *et al.*, 2007; Nunomura *et al.*, 2006; Ferrari *et al.*, 2003). Por tanto, la utilización de antioxidantes externos supone una gran complementación desde el punto de vista terapéutico para mantener el equilibrio redox intracelular.

En este contexto, los oligosacáridos de quitosano presentan gran capacidad de atrapamiento de radicales libres y de interrupción de la reacción en cadena de oxidación originada por los radicales libres, ofreciendo un efecto protector frente al daño oxidativo (Zou *et al.*, 2016; Ngo *et al.*, 2011a; Reuter *et al.*, 2010; Valko *et al.*, 2007). En este sentido, un antioxidante se define como aquel compuesto natural o no, el cual, a bajas concentraciones respecto a una sustancia potencialmente oxidable, previene o retrasa la oxidación de la misma (Halliwell *et al.*, 1988). En función de su mecanismo de acción, los antioxidantes se clasifican en tres grupos:

- Antioxidantes de prevención: impiden la formación de radicales libres.
- Antioxidantes eliminadores (*scavengers*): neutralizan radicales libres al inhibir el inicio de la cadena o romper su propagación.
- Sistemas enzimáticos de reparación o de síntesis de *ново*: reparan los daños producidos y reconstituyen la membrana celular.

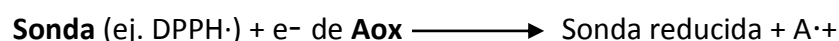
Actualmente las investigaciones se centran en la búsqueda de antioxidantes naturales debido a los efectos adversos que se han encontrado en antioxidantes sintéticos (Halliwell *et al.*, 1995; Suh *et al.*, 2003). Algunos compuestos biológicos, incluyendo carbohidratos, péptidos y algunos compuestos fenólicos, se han identificado como potentes antioxidantes eliminadores. Dentro de los carbohidratos, los COS y su potente actividad antioxidante han sido objeto de numerosos trabajos de investigación (Mengíbar *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2012). Cada vez más autores han confirmado que los carbohidratos procedentes de fuentes naturales muestran gran capacidad como secuestradores de radicales libres, siendo capaces de romper la cadena oxidativa a diferentes niveles (Zou *et al.*, 2016). La administración de COS como posible tratamiento frente al estrés oxidativo tanto *in vivo* como *in vitro*, es un área actualmente en crecimiento (Ngo *et al.*, 2011a; Liu *et al.*, 2009). Incluso se ha investigado su efecto antioxidante en voluntarios humanos (Anraku *et al.*, 2011) sometidos a administración oral del polímero (Chitosamin®), atenuando el desarrollo del estrés oxidativo en el sistema circulatorio.

3.2.1. Métodos de evaluación de la actividad antioxidante

Basándose en la química de las reacciones implicadas en los mecanismos antioxidantes, los métodos más comunes para determinar la actividad antioxidante se pueden dividir en dos grupos principales (Tabart *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2005):

Métodos SET (del inglés *Single Electron Transfer*)

Están basados en un sistema de transferencia de electrones, dando lugar a una reacción redox en la cual el compuesto antioxidante (reflejado en el ejemplo como Aox) cede un electrón a la molécula sonda, produciendo un cambio de color en la misma. Estos ensayos miden la capacidad reductora de un antioxidante (Huang *et al.*, 2005), y se basan en la siguiente reacción representativa:



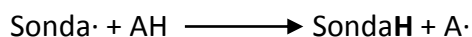
Entre los métodos SET más empleados normalmente se encuentran el método ABTS, el método DPPH o el método FRAP entre otros. Generalmente, la molécula sonda por sí misma es un oxidante que extrae un electrón del antioxidante, provocando un cambio de color. La intensidad del cambio de color es proporcional a la concentración del antioxidante, y la reacción finaliza cuando se estabiliza el cambio colorimétrico. Posteriormente se traza una recta de calibrado entre la concentración del antioxidante y el cambio de absorbancia registrado. La pendiente de la curva refleja la capacidad reductora del antioxidante, que se expresa en equivalentes de trolox (TEAC, del inglés *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*).

En un sistema biológico, es importante el equilibrio entre la formación de moléculas prooxidantes y la defensa antioxidante endógena para proteger las biomoléculas celulares del daño oxidativo generado por las ROS. Estas moléculas participan de manera notable en el desarrollo de numerosas enfermedades tales como el cáncer, hipertensión o inflamación, entre otras (Calabrese *et al.*, 2005).

Métodos HAT (del inglés *Hydrogen Atom Transfer*)

Están basados en la transferencia de un átomo de hidrógeno, donde el antioxidante y un sustrato sonda compiten por los radicales libres. Por tanto, las determinaciones se basan,

generalmente, en el descenso de señal de la molécula sonda. Este tipo de ensayos cuantifican la capacidad donadora de átomos de hidrógeno (Huang *et al.*, 2005). Son los métodos más adecuados para determinar la capacidad de una sustancia para detener la cadena de propagación de radicales libres, fenómeno directamente relacionado con la capacidad de transferencia de átomos de hidrógeno, pero no siempre correlacionado con los potenciales de reducción. La metodología se basa en la siguiente reacción representativa:



Donde la sonda tiene un radical libre y A hace referencia al compuesto antioxidante. Entre los métodos HAT más empleados comúnmente se encuentra el método ORAC (del inglés *Oxygen Radical Absorbance Capacity*), entre otros. Este se utiliza para determinar la capacidad de atrapamiento de radicales del oxígeno o ROS (Huang *et al.*, 2002) y es uno de los pocos métodos que combina tiempo de inhibición con grado de inhibición de un compuesto (Cao *et al.*, 1999). Se puede utilizar una curva de trolox y expresar los resultados en TEAC.

3.2.2. Mecanismos de actividad antioxidante

Los mecanismos de acción antioxidante de las moléculas de quitosano aún no están del todo claros, aunque se suele atribuir dicho efecto a los grupos amino del carbono C-2 y a los grupos hidroxilo de los carbonos C-2, C-3 y C-6 del anillo de piranosa (Zou *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2001). Los grupos NH_2 al igual que los NH_3^+ podrían reaccionar con los radicales libres mediante la formación de un complejo macromolecular estable o mediante reacciones de adición respectivamente (Xie *et al.*, 2001). Chen *et al.*, (2009) plantearon el atrapamiento de radicales libres a través de los electrones de transferencia de los grupos amino y en concreto, relacionan la capacidad de atrapar radicales DPPH por parte de los COS, con la capacidad de estos para donar un electrón al radical DPPH con un electrón desapareado. Dicho efecto depende de la densidad de la nube electrónica de las moléculas de COS y su diferente accesibilidad para atrapar los radicales DPPH. Una alta densidad de nube electrónica aumentaría la capacidad para donar electrones, y a su vez aumentaría la capacidad para atrapar radicales y la capacidad reductora (Sun *et al.*, 2008). Por otro lado, podrían estar los grupos OH participando también de estos mecanismos (Xie, *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2009).

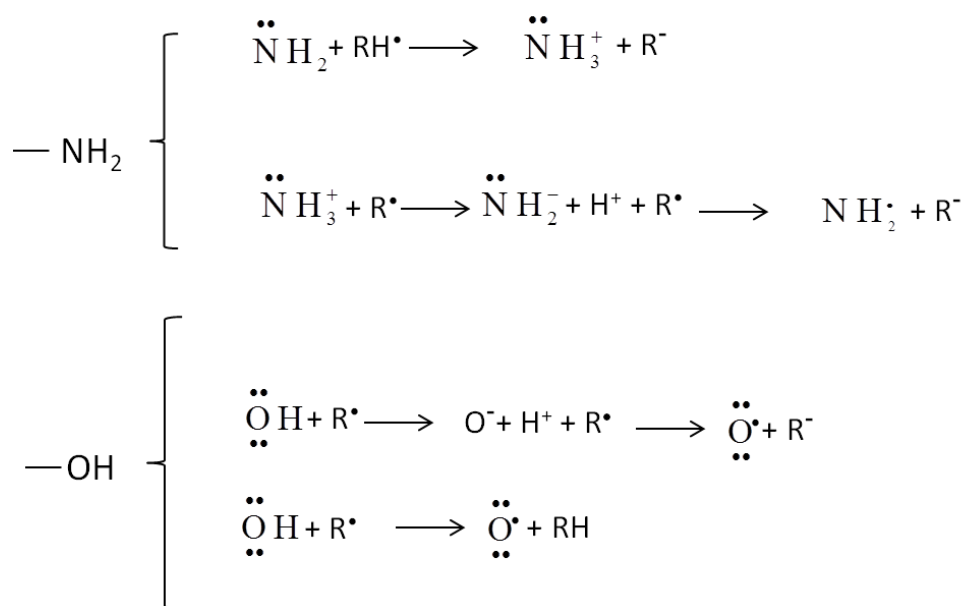


Figura I.5. Esquema representativo del posible mecanismo antioxidante mediante los grupos amino e hidroxilo de las moléculas de quitosano. Fuente: Xie *et al.*, 2001; Chen *et al.*, (2009).

Por otro lado, también se ha descrito que las cadenas de quitosano son capaces de retrasar la oxidación lipídica mediante la quelación de iones de Fe^{2+} a través de sus grupos amino o hidroxilos, inhibiendo así la capacidad oxidante de este metal o su conversión en iones Fe^{3+} (Kim *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 1998). Como consecuencia se forma un complejo ión metálico y polímero mediante la donación de un par de electrones no enlazantes del nitrógeno de los grupos amino o del oxígeno de los grupos hidroxilos a los iones metálicos (Kim *et al.*, 2007). A su vez, la quelación del ión ferroso está estrechamente relacionada con la inhibición de generación de radicales hidroxilo mediante la reacción de Fenton (Halliwell *et al.*, 1995; Andres *et al.*, 2004), en la cual se generan ROS tras la reacción de sulfato de hierro con peróxido de hidrógeno.

En general, existen numerosas investigaciones relativas a la actividad antioxidante de los COS en las que se establece una relación directa de esta actividad con la longitud de las cadenas y el DA del polímero (Je *et al.*, 2004). Parece ser que a menor M_w del polímero mayor actividad presentan las moléculas del quitosano (Mengíbar *et al.*, 2013, Tomida *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2012), y respecto al DA, conforme disminuye este se potencia la actividad antioxidante (Je *et al.*, 2004; Xing *et al.*, 2005). Sin embargo, el efecto del DA no parece estar tan claro. Un exceso de grupos amino protonados podría generar fuerzas electroestáticas de repulsión con el consiguiente aumento del volumen hidrodinámico de las moléculas y con ello cambio en la conformación espacial del polímero (Kamil *et al.*, 2002). En definitiva, por ello se suele atribuir una escasa actividad antioxidante del quitosano respecto a los COS ya que formación de

puentes de hidrógeno intramoleculares como consecuencia del alto número de cargas en la molécula, provocaría este mayor número de fuerzas electrostáticas no favoreciéndose la participación de hidrógenos o electrones de OH o NH₂ en el atrapamiento de radicales libres (cita).

En el contexto celular, la absorción de moléculas del quitosano en el intestino y por parte de otras células, hacen de este polisacárido un compuesto muy prometedor como agente antioxidante (Zou *et al.*, 2016). La presencia de COS aumenta la actividad de enzimas antioxidantes celulares como la superóxido dismutasa, la catalasa o la glutatión peroxidasa, y también disminuye la peroxidación lipídica (Xia *et al.*, 2011). Se ha comprobado la ausencia de efectos citotóxicos de COS (M_w 1-3 kDa) obtenidos mediante hidrólisis ácida y un sistema de UF, y se ha visto que estos son capaces de inhibir la actividad mieloperoxidasa, disminuir los radicales libres y por tanto el daño ocasionado por estos en el ADN y en las proteínas de membrana (Ngo *et al.*, 2008; 2009). En este contexto, Liu *et al.*, (2009) demostraron la capacidad efectiva de COS (DP 2-6; DA < 5 %) para atenuar el estrés oxidativo causado por peróxido de hidrógeno en células endoteliales del cordón umbilical humano. Por otro lado, Ngo *et al.*, (2009) observaron el efecto protector de COS (M_w < 3 kDa; DA < 10 %) frente al estrés oxidativo sobre el ADN y las proteínas de membrana de macrófagos Raw 264.7.

3.3. Capacidad de mucoadhesión

La actual demanda de formas farmacéuticas más efectivas, ha generado un gran interés en el desarrollo de nuevos materiales, dentro de los cuales, los biopolímeros se sitúan como buenos candidatos debido a sus características de biodegradabilidad, biocompatibilidad y versatilidad para usarse en diferentes condiciones. Uno de los fenómenos que despierta gran interés en la formulación de nuevos dispositivos farmacéuticos, es la bioadhesión, entendida esta como la capacidad de un compuesto para adherirse a moléculas de un tejido vivo (Peppas *et al.*, 1985).

La bioadhesividad que proporciona este polisacárido se traduce en un mayor tiempo del compuesto activo en el tracto gastrointestinal, así como una mayor interacción con la mucosa epitelial del tracto digestivo (Soane *et al.*, 1999). Los compuestos mucoadhesivos se presentan como macromoléculas hidrofílicas, y es por ello que el quitosano mediante sus grupos funcionales es un candidato perfecto que se adhiere de forma inespecífica a muchas superficies formadas por mucus (Aranaz *et al.*, 2009; Smart, 2005; Illum *et al.*, 2001; Illum *et al.*, 1994).

Las propiedades mucoadhesivas del quitosano están ampliamente descritas (Rossi *et al.*, 2001; Deacon *et al.*, 2000; He *et al.*, 1998; Lehr *et al.*, 1995) aunque el mecanismo mediante el cual se establece la interacción está escasamente detallado, y sigue siendo objeto de estudio (Perilla *et al.*, 2008). La interacción entre quitosano y mucina estomacal de cerdo confirman que las interacciones electroestáticas se complementan por puentes de hidrógeno y fuerzas hidrofóbicas cuando ambos compuestos están presentes en un ambiente acuoso (Sogias *et al.*, 2008). Este hecho también se ha confirmado en condiciones *in vitro* mediante mediciones de fuerzas de tracción y cizalla (Peppas *et al.*, 1996).

Las mucinas son una familia heterogénea de proteínas de alto peso molecular altamente glicosiladas producidas por células de los tejidos epiteliales de la mayoría de animales. Presentan un núcleo lineal proteico con un alto contenido de serina y treonina, que es glicosilado por cadenas laterales de oligosacáridos. En las regiones terminales amino y carboxilo están levemente glicosiladas y ricas en cisteína, las cuales participan en enlaces disulfuro intra- y/o intermoleculares (Evans *et al.*, 2009; Lai *et al.*, 2009). Los puentes disulfuro entre los dominios ricos en cisteínas crean una estructura tridimensional del polímero la cual se ve reforzada por las fuerzas hidrofóbicas (Turner *et al.*, 1999). Proporcionan un sitio de unión para microorganismos comensales y patógenos, muestran ligandos para leucocitos y células endoteliales (Van Klinken *et al.*, 1995) o bloquear la unión específica de bacterias patógenas (Boren *et al.*, 1993).

Las mezclas heterogéneas de COS, al ser solubles a pH fisiológico, presentan una ventaja respecto a polímeros de alto peso molecular (Zhou *et al.*, 2014), y no son degradados por enzimas gastrointestinales o de la flora una vez ingeridos (Muanprasat *et al.*, 2005), lo cual les permite quedarse adsorbidos en la matriz mucosa del epitelio (Lodhi *et al.*, 2014; Je *et al.*, 2012).

3.4. Actividad antiinflamatoria

Un proceso inflamatorio prolongado en el tiempo puede conllevar el desarrollo de varias enfermedades tales como asma crónica, artritis reumatoide, psoriasis o cáncer, entre otras (Vo *et al.*, 2012). Algunos autores han reportado el potencial de los COS como agentes terapéuticos contra la respuesta inflamatoria (Fernandes *et al.*, 2010; Dou *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009). Se ha sugerido que este efecto antiinflamatorio de los COS sucede a través de la desregulación de factores de transcripción, como TNF- α (del inglés *Tumoral Necrosis Factor*) o

IL-6 (interleuquina-6) (Lee *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2007; Shikhman *et al.*, 2001). Asimismo, también se ha propuesto la influencia del peso molecular de los COS en el efecto antiinflamatorio (Lee *et al.*, 2009).

3.4.1. Evento inflamatorio

De un modo general, la inflamación se define como la respuesta del sistema inmune de un organismo al daño causado a sus células y tejidos. La inflamación se produce en el organismo como respuesta a un daño físico, una infección o una respuesta inmune, y su efecto prolongado en el tiempo puede resultar perjudicial, contribuyendo a la patogénesis de numerosas enfermedades. En función del tiempo de duración, así como del tipo celular principal que participa en la resolución del evento inflamatorio, se puede clasificar la respuesta inflamatoria en aguda o crónica. La inflamación es una respuesta coordinada por una amplia gama de mediadores que forman redes reguladoras complejas compuestas de inductores, sensores, mediadores y efectores. Los inductores son señales que inician la respuesta inflamatoria, los cuales activan sensores especializados que terminarán provocando la producción de mediadores de distinta naturaleza. Los mediadores son capaces de alterar los estados funcionales del órgano o tejido afectado (que serían los efectores de la inflamación), para que puedan adaptarse y resolver el estado inflamatorio (Medzhitov, 2008).

En la respuesta inflamatoria participan distintos tipos celulares (macrófagos, leucocitos, linfocitos), encontrándose dentro de los leucocitos los neutrófilos, células pro-inflamatorias asociadas al daño en los tejidos y ampliamente conocidas por su llegada temprana a los sitios dañados, donde ejercen su actividad fagocítica y liberan el contenido de sus gránulos (Kolaczowska *et al.*, 2013). Por ello, una respuesta inflamatoria aguda con éxito conlleva la eliminación de los agentes infecciosos, seguida de una fase de resolución y reparación, mediada principalmente por la acción de macrófagos residentes y células reclutadas al tejido afectado (Serhan *et al.*, 2005).

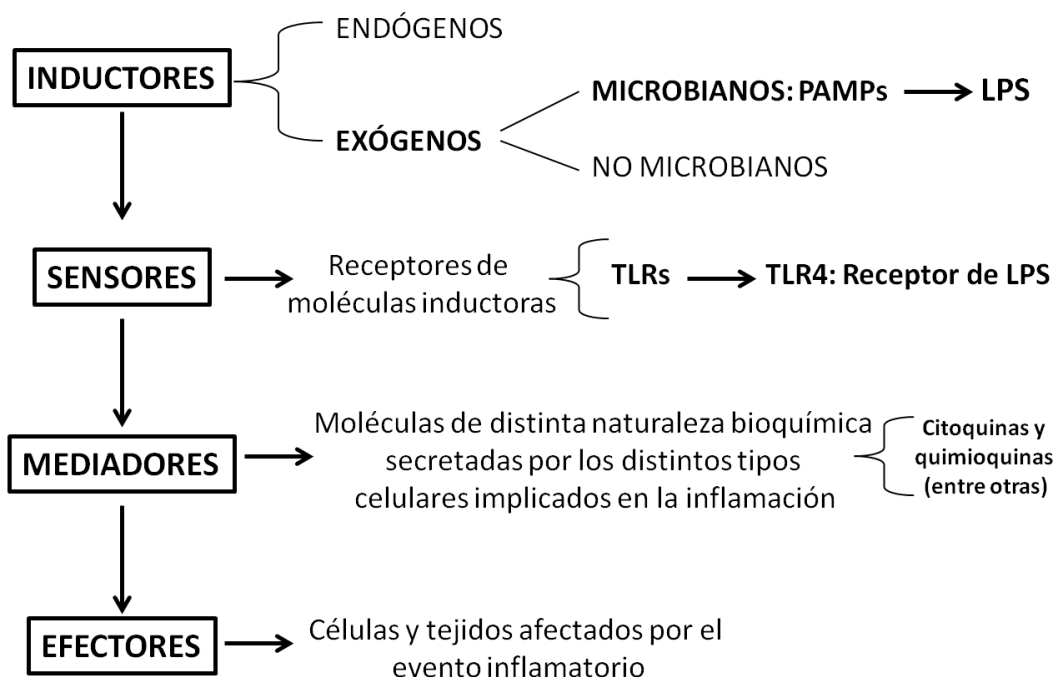


Figura I.6. Esquema resumen del evento inflamatorio.

Inductores de la respuesta inflamatoria

La respuesta inflamatoria se inicia por la acción de una serie de inductores inflamatorios que pueden ser de naturaleza endógena o exógena. Los inductores endógenos incluyen señales provocadas por estrés, daño o mal funcionamiento del tejido u órgano, tales como señales apoptóticas y necróticas (Rock *et al.*, 2008) o productos derivados de la degradación de la matriz extracelular (Hornung *et al.*, 2008).

Por otro lado, los inductores exógenos incluyen señales de origen microbiano o no microbiano. Entre los inductores de naturaleza no microbiana se incluyen los alérgenos y los compuestos tóxicos. En general son partículas indigeribles que, o bien son demasiado grandes para ser fagocitadas, o causan daño en la membrana de los macrófagos.

En cambio, los inductores exógenos microbianos son moléculas muy conservadas en los microorganismos localizadas en su mayoría en su superficie celular externa. Entre ellos se incluyen los factores de virulencia (moléculas derivadas de la acción de agentes patógenos) y los PAMPs (del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Estos últimos presentan diferente naturaleza en función de su origen (bacterias, hongos, virus y parásitos) (Akira *et al.*, 2006). Todo ello conlleva a que el sistema inmune las reconozca como moléculas extrañas. En este grupo también se incluyen moléculas intracelulares del propio huésped, las cuales, bajo

determinadas condiciones fisiológicas, señalizan por los mismos mecanismos que los PAMPs. Según la naturaleza microbiana, destacan diferentes tipos de PAMPs como el LPS procedente de bacterias Gram negativas, el peptidoglicano procedente de bacterias Gram positivas, o el zymosan procedente de la levadura *Sacharomyces cerevisiae*, entre una amplia gama de moléculas. Los PAMPs se unen específicamente a receptores celulares, hecho que no sucede con los factores de virulencia. Los efectos adversos derivados de la actividad de los factores de virulencia son los responsables de desencadenar la respuesta inflamatoria.

Dentro de los inductores exógenos de origen microbiano, el lipopolisacárido bacteriano (LPS) es el más estudiado. Es el componente principal de la membrana externa de bacterias Gram negativas, y actúa como un potente elicitor del sistema inmune en células eucariotas (Banoub *et al.*, 2010). Estructuralmente está compuesto por tres partes bien diferenciadas: el lípido A, disacárido de glucosaminas unidas por enlace β (1 - 6) esterificado con ácidos grasos y responsable de desencadenar la respuesta inmune en el huésped; el núcleo o región R, oligosacárido compuesto internamente por ácido 3-desoxi-D-manooctulosónico y L-glicero-D-manoheptosa, y externamente formado por glucosa, galactosa y N-acetilglucosamina; y la parte externa o antígeno O, formada por oligosacáridos de aminoazúcares de longitud variable. El lípido A es la región responsable de la endotoxicidad de la molécula (Peri *et al.*, 2010) y es la parte por donde se une a los receptores de membrana (TLR4), desencadenando una respuesta inmune.

El núcleo o región R del LPS contiene bastantes cantidades de grupos aniónicos tales como fosfato, pirofosfato o grupos carboxilo. Estas cargas negativas junto con la naturaleza anfipática del LPS hacen posible que reaccione con bastante afinidad con otros ligandos anfipáticos así como catiónicos (Naberezhnykh *et al.*, 2015).

Sensores de la respuesta inflamatoria

Los PAMPs son reconocidos específicamente por receptores de reconocimiento de patógenos o PRRs (del inglés *pattern-recognition receptor*), los cuales están integrados en la membrana citoplasmática o bien en el citosol de células implicadas en la respuesta inflamatoria. Estos receptores se agrupan en cuatro subfamilias en función de su naturaleza y tipo de patrón que reconocen (Akira *et al.*, 2006). Entre todos, el grupo más representativo, por la cantidad de patrones moleculares que son capaces de reconocer, son los receptores tipo TLR (del inglés *Toll like receptor*). Los TLRs son glicoproteínas integrales de membrana con una estructura

trimodular, que se expresan en distintos compartimentos de las células inmunes, capaces de reconocer PAMPs de bacterias, hongos, virus y parásitos (Thompson *et al.*, 2008). La región N-terminal es extracelular y presenta motivos ricos en leucinas, y la región C-terminal es intracelular, formada por 200 aminoácidos (Beutler, 2009; Medzhitov, 2007; Akira *et al.*, 2006; Janeway *et al.*, 2002). Este dominio es necesario para la interacción con diversas moléculas adaptadoras, necesarias para la activación de la vía de señalización de los TLRs. A excepción del TLR3, todos activan vías de señalización dependientes de la proteína adaptadora MyD88, las cuales se explicarán más detalladamente en apartados posteriores.

Mediadores de la respuesta inflamatoria

Debido a la acción de los inductores inflamatorios, los distintos tipos celulares implicados en la inflamación, como plaquetas, células dendríticas, mastocitos, neutrófilos, macrófagos, van a secretar moléculas de distinta naturaleza bioquímica, denominadas mediadores químicos de la inflamación. Estos van a modular el proceso inflamatorio por su capacidad de:

- Alterar la funcionalidad de tejidos y órganos.
- Modular la distribución de vasos sanguíneos del área inflamada y el reclutamiento de células al foco inflamatorio.
- Activar distintos tipos celulares para que a la vez secreten nuevos mediadores inflamatorios.

Los mediadores inflamatorios incluyen moléculas sintetizadas de manera sistémica y secretadas al plasma sanguíneo como precursores inactivos, como las proteínas del sistema del complemento y los péptidos vasoactivos. Por otro lado estarían los mediadores químicos locales, los cuales son secretados por células inflamatorias en respuesta a la acción de un inductor u otro mediador inflamatorio, pudiéndose encontrar ya preformados en gránulos del citoplasma o sintetizarse *de novo*. En este grupo estarían las aminas vasoactivas, los lípidos eicosanoides, el factor activador de plaquetas, las citoquinas y las quimioquinas inflamatorias (Serhan, 2007; Conti *et al.*, 2004; Cunha *et al.*, 2003).

Todos ellos terminarán produciendo un efecto sobre células y tejidos afectados por el evento inflamatorio, los cuales serían los efectores inflamatorios. Estos actuarían con el fin de resolver el episodio inflamatorio y volver a recuperar la homeostasis inicial en el tejido afectado.

La cascada de reacciones por las que estos mediadores químicos producen dolor, no se conoce en su totalidad. Se sabe que muchos actúan directamente, uniéndose a los receptores que hay en las terminaciones nociceptivas, que inervan la zona inflamada y otros, actúan de manera indirecta a través de la inducción de otros mediadores (Marchand *et al.*, 2005).

3.4.2. Vías de señalización dependientes de la proteína adaptadora MyD88

Tras la unión del ligando (PAMP) al receptor (TLR), se induce el reclutamiento de MyD88, con el consiguiente ensamblaje de un complejo proteico IRAK-TRAF (Chen *et al.*, 2006). Posteriormente, este complejo se disocia, e interacciona con una MAP triple quinasa, la cual se activa y su vez activa las vías de las MAP quinasas p38 α , JNK1/2, ERK1/2 y la degradación del factor I κ B α vía proteasoma, produciéndose así la liberación del factor de transcripción NF κ B (Banerjee *et al.*, 2007). Las MAPK y el NF κ B activan la transcripción de mediadores proinflamatorios (Banerjee *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2000; Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999).

Las MAPK o proteínas quinasas activadas por mitógenos constituyen una familia de proteínas estimuladas por factores de crecimiento y diferentes tipos de estrés. Juegan un papel fundamental en la transducción intracelular de señales y con capaces de activar a otras proteínas quinasas, afectando a procesos tan importantes como la mitosis, el metabolismo, la migración celular o la apoptosis (Johnson *et al.*, 2002; Manning *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1995).

Las distintas MAPK pueden clasificarse en cuatro subfamilias (ERK1/2, p38, JNK y ERK5) y cada una está compuesta por un módulo de señalización de tres quinasas evolutivamente conservadas las cuales se activan de una forma secuencial. De esta forma, las MAPKKK activan a las MAPKK mediante fosforilación de residuos de serina y/o treonina, estas a su vez fosforilan a MAPK en residuos de treonina y tirosina (Roux *et al.*, 2004).

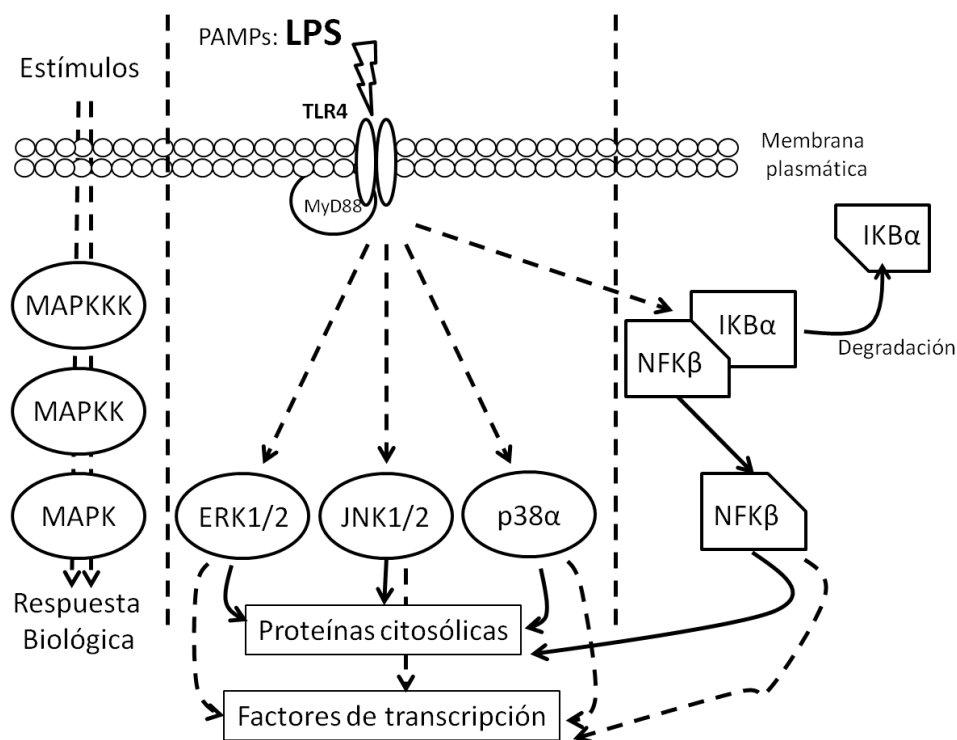


Figura I.7. Esquema resumen de la cascada de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y de la vía del factor de transducción NFKβ.

Numerosos estudios han investigado sobre el efecto protector de los COS frente a una gran diversidad de respuesta inflamatoria. Yoon *et al.* 2007 demostraron que la capacidad antiinflamatoria de los COS (DA 5-10 % e inferior a 10 kDa) en macrófagos Raw 264.7 estimulados con LPS era dependiente de la dosis, y además la presencia de COS en el medio disminuía la expresión génica de citoquinas proinflamatorias. Posteriormente, Fernandes *et al.*, (2010) describieron que este efecto era dependiente del peso molecular de los COS (DA 15-20 %), obteniendo mayor capacidad para atenuar la inflamación en COS de 1,2 kDa frente a COS de 5,3 kDa. Qiao *et al.*, 2011 demostraron el efecto protector de COS en ratones con un DA del 10 % y un DP entre 2 y 6 tras inducir inflamación mediante inyección intraperitoneal de LPS. Estos autores demostraron la disminución de marcadores proinflamatorios para el reclutamiento de neutrófilos y la atenuación de la vía de la MAPK p38α. Bahar *et al.*, (2012) estudiaron el efecto de los COS en la expresión génica de citoquinas en células Caco-2, concluyendo que los COS desregularon la expresión de citoquinas proinflamatorias.

II. OBJETIVOS

Esta Tesis Doctoral se ha desarrollado dentro de la línea de investigación del grupo de la UCM 920071 “Investigaciones en el sistema quitina/quitosano” dirigido por la Doctora Ángeles Heras Caballero, centrado en la caracterización fisicoquímica y funcional de los quitosanos, así como en la aplicación tecnológica de este biopolímero y de los quitooligosacáridos.

Esta Tesis Doctoral se ha centrado en la obtención de COS mediante diferentes procesos y en su caracterización fisicoquímica y funcional. El objetivo principal ha sido búsqueda de relaciones entre las características fisicoquímicas y las propiedades biológicas que ayuden a esclarecer los mecanismos de acción de los COS.

Este objetivo general se encuentra dividido en los siguientes objetivos específicos:

1. Obtención de COS por tres procesos químicos y enzimáticos diferentes y con características fisicoquímicas específicas.
2. Caracterización fisicoquímica de los COS determinando los principales parámetros que van a influir en su actividad biológica.
3. Caracterización funcional de los COS en términos de capacidad antibacteriana, antioxidante, mucoadhesiva y antiinflamatoria.
4. Relación entre las características fisicoquímicas de los COS y la actividad antibacteriana, antioxidante, mucoadhesiva y antiinflamatoria.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

Reactivos	Casa comercial
- Ácido clorhídrico deuterado	Sigma-Aldrich®
- Agua deuterada	
- Nitrito de potasio	
- 1,2-propanodiol	Panreac®
- Ácido acético glacial	
- Ácido clorhídrico	
- Acetona	
- Amoníaco	
- Anhídrido acético	
- Etanol	
- Hidróxido sódico	Merk-Millipore®
- Acetato de amonio	
- Acetato de sodio	
- Acetonitrilo	
- Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	

2. MUESTRAS DE QUITOSANOS

La obtención de COS se realizó a partir de dos quitosanos: quitosano A (QsA) procedente de la especie *Pandalus borealis* del Atlántico Norte suministrado por Novamatrix (Noruega), y quitosano B (QsB) procedente de *Lithodes antarcticus*, suministrado por Infiquis S.L. (Madrid, España).

3. PURIFICACIÓN DE LOS QUITOSANOS

La purificación de los quitosanos originales se llevó a cabo mediante su disolución en ácido acético 0,1 M al 0,5 % (p/v) y posterior filtración secuencial a través de filtros de vidrio (Álamo®, España) con membranas de tamaños de poro decrecientes: 250-160 µm, 100-40 µm y 16-10 µm. A continuación, se precipitó el quitosano con hidróxido sódico al 10 % (p/v) hasta alcanzar un pH próximo a 8. Una vez precipitado el polímero, se centrifugó la solución, se descartó el sobrenadante y se hicieron una serie de lavados con mezclas de etanol: agua en proporción 70:30, 80:20 y 90:10 hasta alcanzar la neutralización. Finalmente se secó el quitosano en una estufa a 50°C y se pulverizó empleando un molinillo eléctrico (Moulinex®) para su posterior uso.

4. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS QUITOSANOS

4.1. Determinación del contenido en humedad

La cantidad de agua presente en las muestras de quitosano se determinó mediante gravimetría, secando 0,3 g de cada muestra en estufa de vacío (Selecta, Vaciotem) a 105°C y 0,8 bares de presión hasta peso constante. Las determinaciones se realizaron por triplicado, y el contenido en humedad se determinó según la siguiente ecuación (1):

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{p1 - p2}{p1} \times 100 \quad (1)$$

Siendo p1 el peso inicial de la muestra, y p2 el peso de la muestra seca.

4.2. Determinación del contenido en materia inorgánica

La cantidad total de materia inorgánica presente en las muestras de quitosano se determinó por gravimetría, llegando hasta la obtención de cenizas tras la calcinación de 0,5 g de muestra a 800°C en una mufla (NEY, Vulcan A-130). Las determinaciones se realizaron por triplicado y el porcentaje de cenizas se determinó mediante la siguiente ecuación (2):

$$\text{Cenizas (\%)} = \frac{p2}{p1} \times 100 \quad (2)$$

Siendo p1 el peso de la muestra seca, teniendo en cuenta el contenido de agua, y p2 peso de cenizas obtenidas.

4.3. Viscosimetría

Se prepararon disoluciones de los quitosanos originales al 0,1 % (p/v) en tampón 0,3 M de ácido acético/ 0,2 M de acetato de sodio (0,3 M CH₃COOH/0,2 M CH₃COONa) pH 4,5 (Rinaudo *et al.*, 1993) para calcular la viscosidad intrínseca, utilizando un viscosímetro capilar tipo Ubbelohde acoplado a un cronómetro de medición automático Visco Clock (Schott-Instruments, Alemania) en un baño de agua termostatzado a temperatura constante de 25 °C. Se utilizó un capilar modelo N^o.525.20/II de 1,03 mm de diámetro. Se procedió midiendo viscosidad cinemática y calculando la viscosidad intrínseca (η) según Wang *et al.*, (1991) y Argüelles *et al.*, (2004) mediante las aproximaciones de Huggins y Kraemer (Huggins, 1942).

4.4. Determinación del grado de acetilación

El DA del quitosano original, así como de los COS obtenidos, se determinó mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón (^1H -RMN). Para ello, se disolvieron las muestras en agua deuterada (D_2O) al 0,5 % (p/v), se añadió 1% (v/v) de ácido clorhídrico deuterado (DCI) y se transfirieron las disoluciones a tubos de RMN de 5 mm. Las medidas se llevaron a cabo en un espectrómetro Bruker AV 300 (Bruker®, Centro de Asistencia a la Investigación de la Universidad de Münster, Alemania, en colaboración con el grupo de investigación del Dr. Francisco M. Gooycolea) con las siguientes condiciones de adquisición: temperatura ambiente, tiempo de adquisición 1 s, frecuencia de 300 MHz y número de barridos 32. El DA se calculó según la siguiente ecuación (3) (Hirai *et al.*, 1991):

$$\frac{1/3 \text{ Señal CH3}}{1/6 \text{ Señal H2} - \text{H6}} \times 100 = \text{DA (\%)} \quad (3)$$

4.5. Determinación del peso molecular promedio

El \overline{M}_w de los quitosanos originales se determinó mediante cromatografía de exclusión molecular (HP-SEC, del inglés High Performance Size Exclusion Chromatography). Se prepararon disoluciones de los quitosanos originales al 0,1 % (p/v) en tampón 0,2 M de ácido acético/ 0,15 M de acetato de amonio (0,2 M CH_3COOH /0,15 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$) pH 4,5 y se filtraron las disoluciones por filtros de jeringa de acetato de celulosa de 0,45 μm (Merk-Millipore®) de tamaño de poro antes de ser inyectadas (20 μl). Se utilizó un sistema cromatográfico compuesto por una bomba Waters® 625 LC System, una columna Ultrahydrogel (Waters, i.d.=7,8 mm, L=300 mm) termostatzada a 35 °C, un refractómetro diferencial Waters 2414 y un detector de dispersión de luz, Evaporative Light Scattering (ELS Waters 2424 Milford, Estados Unidos) conectados en paralelo. El flujo se mantuvo a 0,5 ml/min y como eluyente se utilizó el mismo tampón en el que se disolvieron previamente las muestras. El \overline{M}_w y el índice de polidispersidad (PDI, del inglés Polydispersity Index) se calculó mediante extrapolación de los resultados en una curva de distintos quitosanos de pesos moleculares promedio conocidos (Mengíbar *et al.*, 2013), utilizando el programa EmpowerPro (Waters®).

5. PROCESOS DE OBTENCIÓN DE QUITOOLIGOSACÁRIDOS

5.1. Proceso 1

Los quitosanos QsA y QsB se disolvieron en al 0,5% (p/v) en tampón 0,2 M CH_3COOH /0,2 M CH_3COONa pH 5,7 y se añadió quitosanas (EC 3.2.1.132) procedente de *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich®) en una relación enzima: sustrato 1:10, empleando una concentración de enzima de $3,48 \times 10^{-3}$ mg/ml. La reacción se llevó a cabo durante 4 días a temperatura constante de 37°C y en agitación (100 rpm), y se detuvo mediante calentamiento a 100°C durante 10 minutos.

5.2. Proceso 2

Los quitosanos QsA y QsB se sometieron a una hidrólisis química en condiciones ácidas de acuerdo al método propuesto por Allan *et al.*, (1995a, 1995b). Estos se disolvieron en HCl 0,1M al 0,68% (p/v), y se añadió nitrito potásico (KNO_2) 31,36 mM al 3,75% (v/v) como agente despolimerizante, y la reacción se llevó a cabo durante 30 minutos a 37°C y con agitación a 100 rpm. Finalmente el quitosano hidrolizado se precipitó con amoníaco, se centrifugó para descartar el sobrenadante y se lavó con sucesivas mezclas de etanol: agua en proporciones 70:30, 80:20 y 90:10 hasta alcanzar la neutralización. Finalmente se secó el quitosano en una estufa a 50°C y se pulverizó empleando un molinillo eléctrico para su posterior uso. Los polímeros de quitosano resultantes de esta modificación se denominaron QsA-Q y QsB-Q respectivamente. En la segunda etapa de este proceso, los quitosanos QsA-Q y QsB-Q se sometieron a una hidrólisis enzimática bajo las mismas condiciones que en el P1 (véase apartado 5.1 de este capítulo).

5.3. Proceso 3

Los quitosanos QsA y QsB se sometieron a una reacción de reacetilación y se disolvieron en CH_3COOH 0,5 M al 1 % (p/v) por separado. Esta disolución se llevó a una concentración final de 0,5 % mediante la adición de 1,2-propanodiol. A continuación, teniendo en cuenta el DA del polímero de quitosano inicial, se añadió una cantidad estequiométrica de anhídrido acético disuelto en 1,2-propanodiol hasta alcanzar el DA deseado. Después de agitar (100 rpm) durante una hora y media para que tuviera lugar la reacción, el quitosano obtenido se precipitó con una mezcla de amoníaco/agua al 30 % (p/v) y se centrifugó para retirar el

sobrenadante. A continuación se lavó con mezclas sucesivas de etanol: agua en diferentes proporciones (70:30, 80:20 y 90:10) hasta alcanzar la neutralización. Finalmente se secó en una estufa a 50°C y se pulverizó empleando un molinillo eléctrico para su posterior uso. Los quitosanos resultantes de esta modificación se denominaron QsA-R y QsB-R respectivamente. En la segunda etapa de este proceso, los quitosanos QsA-R y QsB-R se sometieron a una hidrólisis enzimática bajo las mismas condiciones que en el P1 (véase apartado 5.1 de este capítulo).

5.4. Separación y purificación de los COS

Una vez detenida la acción enzimática, se separaron las diferentes fracciones de COS a través de un sistema de ultrafiltración tangencial basado en un concentrador (Sistema Vivaflow® 200, Sartorius, España) acoplado a membranas de polietersulfona de baja adsorción inespecífica de diferentes tamaños de corte molecular (30, 10 y 5 kDa), obteniéndose las siguientes fracciones de COS según rangos de peso molecular: COS 1 (M_w 30-10 kDa), COS 2 (M_w 10-5 kDa) y COS 3 (M_w <5 kDa). Las fracciones de COS retenidas se lavaron con 4 volúmenes de 500 ml de tampón 0,2 M CH_3COOH /0,2 M CH_3COONa pH 5,7 y se dializaron empleando membranas de diálisis (Medicell International Ltd, Reino Unido) de tamaño de poro de 12-14, 7 y 3,5 kDa. Las diálisis se llevaron a cabo a 4°C frente a agua destilada hasta la completa eliminación de las sales. Finalmente las fracciones se congelaron a -80°C y se liofilizaron.

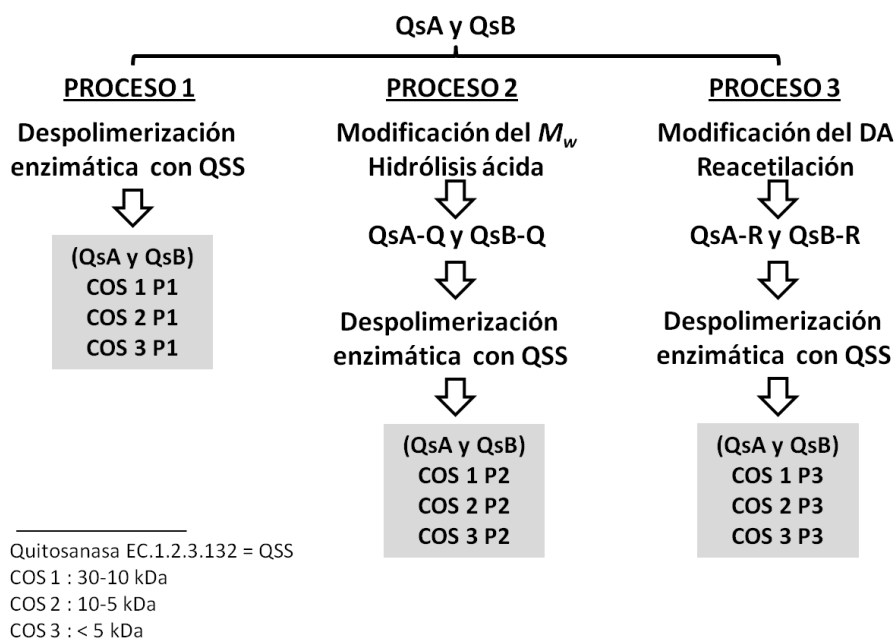


Figura III.1. Esquema resumen de los diferentes procesos de obtención de COS. Cada proceso se llevó a cabo sobre QsA y QsB por separado.

6. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS QUITOOLIGOSACÁRIDOS

6.1. Determinación del grado de acetilación

El DA de todos los COS obtenidos se determinó por espectroscopia ^1H -RMN de la misma manera que se describe en el apartado 4.4 de este capítulo.

6.2. Determinación de productos de glicación avanzada de la Reacción de Maillard

La determinación de los productos de glicación avanzada (AGEs) de la Reacción de Maillard se llevó a cabo mediante espectroscopia de fluorescencia según el método propuesto por Wang *et al.*, (2009), mediante el cual se adquirieron los espectros de fluorescencia de soluciones de COS disueltas en agua (1 mg/ml) a las longitud de onda de excitación $\lambda_{\text{Ex}} = 338$ nm y recogiendo la longitud de onda emitida en el intervalo $\lambda_{\text{Em}} = 350 - 550$ nm. Se utilizó un fluorímetro Perkin Elmer 50B (Estados Unidos). Se utilizaron rendijas de excitación y emisión de 3 y 5 mm, respectivamente. En todos los experimentos se utilizaron microcubetas Hellma de 1 cm, con un volumen de 200 μl de muestra de COS. La temperatura se mantuvo constante a 25°C utilizando un baño programable Neslab RTE-111.

6.3. Determinación de patrón de acetilación

El PA se determinó mediante espectroscopia ^{13}C -RMN. Para ello se disolvieron las muestras en D_2O al 5 % (p/v), se añadió 1% (v/v) de DCl y las disoluciones se transfirieron a tubos de RMN de 5 mm. Las medidas se llevaron a cabo en un espectrómetro Agilent DD2 600 (Agilent Technologies®, Centro de Asistencia a la Investigación de la Universidad de Münster, Alemania) bajo las siguientes condiciones: temperatura 70 °C, tiempo de adquisición 1,5 s, frecuencia de 600 MHz y número de barridos 5788. El PA se calculó según la siguiente ecuación (4) (Weinhold *et al.*, 2009b):

$$FA = \frac{F_{AD}}{(2 \cdot F_{AA}) + F_{AD}} + \frac{F_{AD}}{(2 \cdot F_{DD}) + F_{AD}} \quad (4)$$

6.4. Determinación del peso molecular promedio y de la distribución de DP

El \overline{M}_w y la distribución de DP se determinaron mediante diferentes técnicas cromatográficas y espectrométricas en función del rango de M_w de separación de las fracciones obtenidas.

El \overline{M}_w y PDI de los COS 1 (M_w 30-10 kDa) y COS 2 (M_w 10-5 kDa) se determinó mediante HP-SEC, utilizando el mismo sistema cromatográfico que se describió en el apartado 4.5 de este capítulo.

La distribución de DP de los COS 2 se determinó por HP-SEC en un sistema cromatográfico Agilent 1200® compuesto por un sistema de columnas HiLoad 26/600 Superdex 30 Prep Grade (GE Healthcare Life Science, i.d.=26 mm, L=600 mm) acoplado a un detector índice de refracción (Agilent Serie 1200 RID®). Las muestras se disolvieron al 0,2% (p/v) en tampón 0,2 M CH_3COOH /0,15 M $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ pH 4,5, y el flujo se mantuvo a 0,6 ml/min. Se colectaron fracciones de 6 ml, las cuales se liofilizaron y se disolvieron en un ml de agua Milli-Q para su posterior análisis mediante cromatografía de alta afinidad (UHPLC) en un sistema Ultimate® 3000 LC System (Dionex, Estados Unidos) formado por un sistema de columnas Acquity UPLC BEH Amide (1,7 μm ; 2,1 mm x 150 mm) y una pre-columna VanGuard (1,7 μm ; 2,1 mm x 5 mm; Waters Corporation®, Estados Unidos), un detector de dispersión de luz Evaporating Light Scattering (ELSD 85, Sedere, Alfortville Cedex, Francia) y un detector de ionización por trampa de iones (ESI-IT-MS) Bruker HTC Esquire Series. La fase móvil estaba compuesta por acetonitrilo/agua 80:20 (v/v), contenía 0,01 M de formiato de amonio y 0,05 M de ácido fórmico, y el flujo se mantuvo a 0,4 ml/min. Se utilizó el programa mMass² para asignar el DP y la composición intramolecular según su relación carga masa (m/z), comparándolas con las masas calculadas teóricamente.

6.5. Análisis de la composición intramolecular y de la distribución de DP de COS 2 y COS 3

El análisis de la composición intramolecular y de la distribución de DP de los COS 3 y COS 2 (M_w <5 kDa y M_w 10-5 kDa) se llevó a cabo mediante espectrometría de masas de ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF-MS) en un equipo Autoflex Speed MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Centro de Asistencia a la Investigación de la Universidad de Münster, Alemania) equipado con un láser SmartBeam™ NdYAG (355 nm). Para ello, se depositó la muestra en una placa de acero junto con la matriz de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (10 mg/ml en

² <http://www.mmass.org/>

acetonitrilo/agua (1:1)) y se secó con aire frío. Los espectros de masas fueron adquiridos en modo positivo lineal. Se utilizó el programa mMass¹ para asignar el DP y la composición intramolecular según su relación carga masa (m/z), comparándolas con las masas calculadas teóricamente.

6.6. Despolimerización de los COS 1 con quitosanasa específica (CTS) y análisis de los productos por MALDI-TOF-MS

Los COS 1 (M_w 30-10 kDa) se sometieron a una hidrólisis con una quitosanasa específica (CTS) procedente de *Alternaria alternata* proporcionada por el grupo del Dr. Bruno M. Moerschbacher de la Universidad de Münster (Alemania).

Estas muestras se disolvieron en tampón $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0,2 M pH 4,2 al 0,1% (p/v). Un microlitro de la enzima CTS (1 mg/ml, en el mismo tampón) se añadió a 50 μl de disolución y se incubó durante 24-48 horas a 37°C. A continuación el tampón se evaporó por centrifugación empleando vacío (Concentrator Plus Centrifugal Vacuum, Eppendorf®) durante 10 minutos a 18000 g y a 4°C, y la muestra se lavó con agua Milli-Q tres veces, evaporando con vacío tras cada lavado. Finalmente la muestra se disolvió en 40 μl de acetona y se utilizó para analizar por espectrometría de masas MALDI-TOF-MS en las mismas condiciones descritas en el apartado 6.5 de este capítulo.

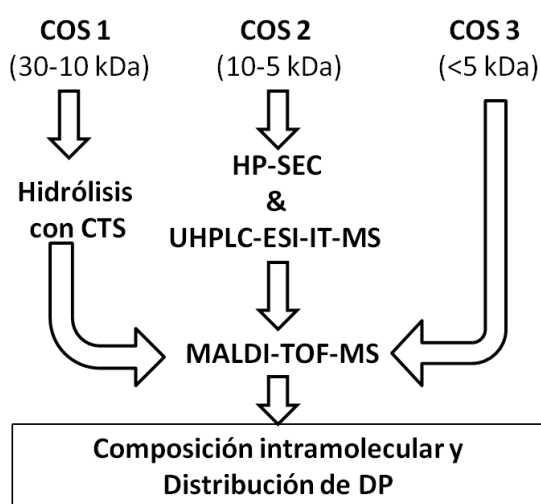


Figura III.2. Esquema resumen de las técnicas empleadas para analizar la composición intramolecular de las fracciones de COS obtenidas mediante P1, P2 y P3.

7. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FUNCIONALES DE LOS COS

7.1. Actividad antibacteriana de los COS

Los experimentos que se describen en este apartado se realizaron en colaboración con la empresa de base tecnológica de la UCM, Infiquis S.L., en sus instalaciones en la Fundación Parque Científico de Madrid.

7.1.1. Materiales

Cultivo celular	Casa comercial
- Medio mínimo Lennox Broth (LB) ³	
- Caldo Infusión de cerebro y corazón (BHI, del inglés Brain Heart Infusion) ³	Laboratorios Conda S.A. (Torrejón de Ardoz, España)
- Caldo de soja y tripticaseína (TSB) ³	
Penicilina-Estreptomicina	Life Technologies (Estados Unidos)
Placas y botellas de cultivo microbiológico	Falcon®

7.1.2. Cultivo de cepas

Especies bacterianas	Medio de cultivo
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) ⁴	Gram negativa LB, 37°C
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 934 (<i>L. monocytogenes</i>) ⁵	Gram positiva BHI, 37°C

7.1.3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Se estudió el efecto de las muestras de COS frente a distintas especies bacterianas Gram negativas y positivas. Cada cepa bacteriana fue subcultivada 24 horas hasta la fase de crecimiento exponencial para preparar alícuotas de 10⁵ ufc/ml. Las muestras de COS se disolvieron en el medio de cultivo correspondiente a una concentración de 10mg/ml. Las soluciones se esterilizaron empleando filtros estériles de acetato de celulosa de 0,22 µm de diámetro, y a partir de ésta solución se prepararon concentraciones de 5, 2 y 1 mg/ml. En una microplaca p96 se mezclaron 200 µl de alícuota bacteriana y 20 µl de solución de COS, y se incubaron durante 20-24 horas a la temperatura correspondiente para cada microorganismo.

³ Los medios empleados se prepararon según las instrucciones proporcionadas por la casa comercial.

⁴ Esta cepa fue donada por la Fundación Parque Científico de Madrid.

⁵ Esta cepa procede de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España)

El crecimiento bacteriano se determinó midiendo la turbidez a 620 nm en un lector de placas Biochrom Asys Expert Plus Microplate Reader (Biochrom, Reino Unido), y esta se referenció a alícuotas de cada cepa bacteriana sin tratamiento, a cuyo valor de absorbancia se le otorgó el valor de 100 % de crecimiento bacteriano. Los resultados se expresan como Índice de Inhibición del Crecimiento Respecto al Control. A partir de estos resultados se determinó la concentración mínima inhibitoria que se define como la menor concentración de COS capaz de inhibir el crecimiento bacteriano después de 24 horas de incubación. Los ensayos se realizaron por triplicado.

7.2. Actividad antioxidante de los COS

La actividad antioxidante de los COS se determinó mediante diferentes métodos de atrapamiento de radicales libres, como el método DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidracil), el método ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico), y el método ORAC (del inglés Oxygen Radical Absorbance Capacity). Además se utilizó un método basado en la capacidad de reducir iones férricos (FRAP, del inglés Ferric Reducing Ability of Plasma). En todos los métodos propuestos se emplea como referencia la actividad antioxidante que presenta el Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), un derivado sintético de la vitamina E, y los resultados se expresan como Capacidad Antioxidante en Equivalentes de Trolox (TEAC, del inglés Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) en μmol equivalentes de trolox/g de muestra de COS (μmol Eq. Trolox/g). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

7.2.1. Materiales

Materiales	Casa comercial
- 1,1-difenil-2-picril-hidracil	Sigma-Aldrich®
- 2, 2'- Azobis (2-amidinopropano dihidrocloruro)	
- 2,4,6-tripiridil-s-triazina	
- Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolín)-6-sulfónico	
- Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-carboxílico	
- Cloruro de hierro	Panreac®
- Fosfato de sodio	
- Persulfato potásico	
- Metanol	
- 3',6'-dihidroxi fluorano	

7.2.2. Método DPPH

Este ensayo está basado en el método propuesto por Chen *et al.*, (2009) con ligeras modificaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio. Se basa en la capacidad de neutralizar o “atrapar” radicales libres de DPPH, que se forman directamente al disolver DPPH en un medio orgánico. En su forma radical libre, el DPPH absorbe a 517 nm, y cuando es reducido por un antioxidante, esta absorción desaparece. Así se evaluó la capacidad antioxidante de los COS. Las muestras de COS se disolvieron al 1% (p/v) en agua Milli-Q y el DPPH se preparó a una concentración de 100 μ M en metanol. A 250 μ l de la solución de COS se le añadió 1 ml de la solución de DPPH, se agitó en vórtex y la mezcla se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente durante una hora. Transcurrido este periodo se realizaron medidas de absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro Specord® 205 (Analytik Jena, Alemania). Como patrón se utilizó una curva de Trolox en agua Milli-Q en un intervalo de concentraciones de 0 a 150 μ M empleándose como blanco agua Milli-Q.

7.2.3. Método ABTS

Este ensayo está basado en el método propuesto por Re *et al.*, (1999) con ligeras modificaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio. Se basa en la capacidad del persulfato potásico para generar radicales peroxilo que van a oxidar el ABTS, generando el radical catión ABTS^{•+}, hidrosoluble y de intenso color. La capacidad antioxidante de los COS se evaluó mediante inhibición óptica, complementaria a la absorbancia, al reaccionar directamente con el radical de ABTS. Las muestras de COS se disolvieron al 1% (p/v) en agua Milli-Q y el reactivo ABTS se preparó a una concentración de 7 mM en etanol. A 10 ml de reactivo ABTS se le añadieron 176 μ l de persulfato potásico 140 mM y la mezcla se mantuvo en oscuridad a temperatura ambiente con agitación (100 rpm) durante 14-16 horas. Transcurrido este tiempo, esta mezcla se diluyó con etanol hasta alcanzar un valor de absorbancia de $0,70 \pm 0,02$ a 734 nm equilibrado a 30°C. A 1 ml de mezcla de reactivo ABTS más persulfato se le añadieron 50 μ l de la muestra de COS, se agitó con vórtex, y se mantuvo en oscuridad a 30°C durante 10 minutos. Transcurrido este periodo se realizaron medidas de absorbancia a 734 nm en un espectrofotómetro Specord® 205 (Analytik Jena, Alemania). Como patrón se utilizó una curva de Trolox en agua Milli-Q en un intervalo de concentraciones de 0 a 600 μ M empleándose como blanco agua Milli-Q.

7.2.4. Método FRAP

Este ensayo está basado en el método propuesto por Benzie *et al.*, (1996) y modificado por Pulido *et al.*, (2000). Se basa en la capacidad que tiene el compuesto antioxidante para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} . Así, mediante medidas de absorbancia, se evaluó la capacidad antioxidante de los COS para reducir el Fe^{3+} del complejo férrico-2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) incoloro a la forma ferrosa coloreada, que tiene un máximo de absorbancia a 595 nm. Las muestras de COS se disolvieron al 1% (p/v) en agua Milli-Q y el reactivo FRAP se preparó mezclando 25 ml de tampón 0,3 M de ácido acético/acetato de sodio pH 3,6, con 2,5 ml de TPTZ 10 mM en HCl 400 mM y con 2,5 ml de cloruro de hierro 20 mM, que se mantuvo a 37°C hasta su uso. A 30 μl de la solución de COS se le añadieron 90 μl de agua Milli-Q y 900 μl del reactivo FRAP. La mezcla se agitó en vórtex y se calentó a 37°C durante media hora. Transcurrido este periodo se realizaron medidas de absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro Specord® 205 (Analytik Jena, Alemania). Como patrón se utilizó una curva de Trolox en agua Milli-Q en un intervalo de concentraciones de 0 a 800 μM y como blanco se utilizó agua Milli-Q.

7.2.5. Método ORAC

Este ensayo que determina capacidad de absorción de radicales de oxígeno, está basado en el método propuesto por Huang *et al.*, (2002) y se llevó a cabo con ligeras modificaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio. Se basa en la capacidad del AAPH (2, 2'-Azobis(2-amidinopropano dihidrocloruro)) para generar radicales peroxilo ($\text{ROO}\cdot$), los cuales van a reaccionar con la fluoresceína (3',6'-dihidroxi fluorano), disminuyendo así su fluorescencia. Para este ensayo se utilizaron microplacas de fluorescencia de 96 pocillos (Microfluoar 2, Thermoscientific, España) y un lector de placas Bio-Tek FL 600™ (Biotek® Instrument Inc, Estados Unidos). Las muestras de COS se disolvieron al 1% (p/v) en agua Milli-Q. El reactivo de fluoresceína se preparó a concentración $8,16 \times 10^{-5}$ mM en tampón fosfato de sodio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 75 mM pH 7,4 y por otro lado el reactivo AAPH a concentración 153 mM en el mismo tampón fosfato. A 150 μl de solución de fluoresceína se le añadieron 25 μl de distintas diluciones de solución de COS y se mantuvo durante 15 minutos en reposo a 37°C. Transcurrido este periodo se añadieron 25 μl de reactivo AAPH, y se inició una cinética de 2 horas en el fluorímetro, equilibrado a 37°C. La fluorescencia se leyó a 485 nm de excitación y a 528 nm de emisión hasta su completa extinción. Estas medidas permitieron calcular el área bajo la curva, la cual incrementa de manera lineal en presencia de agentes antioxidantes en el medio. Como patrón se utilizó una curva de Trolox en tampón $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 75 mM pH

7,4 en un intervalo de concentraciones de 6 a 75 μM y como blanco tampón $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$.

7.3. Mucoadhesividad de los COS

La mucoadhesividad de los COS se evaluó a través de medidas de potencial zeta de la densidad de carga superficial de la mucina, la cual varía en función de la interacción que se produzca entre mucina y COS. Se preparó una suspensión de mucina gástrica porcina tipo III (Sigma-Aldrich®) al 1 % en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 6,8 y se mantuvo en agitación durante 10 h a 37°C. Tras sonicar la solución de mucina durante un par de minutos, esta se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos, y se extrajo el sobrenadante, con el que se realizaron las mezclas mucina-COS. A estas mezclas se les midió el potencial zeta en un Zeta Sizer Nanoseries de Malvern.

7.4. Actividad antiinflamatoria

Los experimentos que se describen en este apartado se realizaron en colaboración con la Dra. Margarita Fernández (Profesora titular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid) y la Dra. Susana Alemany (Investigador del Centro de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, CSIC, Madrid).

7.4.1. Materiales

Cultivo celular	Casa comercial
- DMEM-HEPES ⁶ (del inglés Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Sigma-Aldrich®
- Suero fetal bovino (FBS)	
- Fungizona (Anfotericina B) ⁶	
Gentamicina	Laboratorios Normon S.A. (Tres Cantos, Madrid)
Placas y botellas de cultivo celular	Falcon®
Raspadores	Costar®
- L-Glutamina	Life Technologies (Estados Unidos)
- Penicilina-Estreptomicina	
- Tripsina	

⁶ Estos medios fueron suministrados por el Servicio Técnico de Preparación de Medios de Cultivo del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols".

Anticuerpos primarios utilizados para Western Blot	
- P-p44/42MAPK(T202/Y204) (pErk1/2)	
- P-T180/Y182 p38 α (pp38)	Cell Signalling Technology [®]
- IKB α (44D4)	
P-T183/Y185 JNK1/2 (pJnk1/2)	Promega Biotech Ibérica S.L. (España)
- Erk2	
- α -tubulina (B-7)	Santa Cruz Biotechnology [®]
Anticuerpos secundarios utilizados para Western Blot	
Anti-IgG de conejo (GAR)	Cell Signalling Technology [®]
Anti-IgG de ratón (GAM)	Amersham Biosciences (Estados Unidos)
Anticuerpos acoplados a fluoróforos utilizados para citometría de flujo	
Anti-Gr1 (Ly6C/G) FTIC de ratón	eBioscience (Estados Unidos)
Estímulos e inhibidores	
- Lipopolisacárido (LPS) (<i>Salmonella enterica serotipo typhimurium</i>)	Sigma-Aldrich [®]
- Sulfato de polimixina B	
- Citocalasina B (<i>Drechslera dematioidea</i>)	
Tampones y soluciones	Composición
Tris tampón salino (TBS) ⁷	(Tris-HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM)
Tween-Tris tampón salino (TTBS) ⁷	(TBS; 0,01% Tween 20 (Sigma-Aldrich [®]))
Tampón de lisis ⁷	(HEPES 50 mM pH 7,4; glicerol 10%; NaCl 150 mM; NP-40 1%; EDTA 1mM; EGTA 1 mM; benzamidina 10 mM; PMSF 0,1 mM; mini tableta de inhibidores de proteasas de Roche [®] ; 50 μ l de mezcla de inhibidores de fosfatasa 1 y 2 de Sigma-Aldrich [®] por 50 ml de solución de lisis)
Tampón de carga proteínas (Laemmli) ⁷	(Tris-HCl 250 mM pH 6,8; SDS 10%, glicerol 25%, azul de bromofenol 0,04%; DTT 0,1M)
ECL	(Luminol 1,25 mM; p-cumárico 0,275 mM; H ₂ O ₂ 0,009%)
PBS ⁷	(Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O 43 mM, KH ₂ PO ₄ 1,4 M, NaCl 137 mM, KCl 27 mM)
Otros reactivos	Casa comercial
- Rojo Ponceau	Carlo Erba Reagents S.A. (España)
- Dimetil sulfóxido (DMSO)	
Leche semidesnatada en polvo	Central Lechera Asturiana S.A. (España)
Membrana de PVDF Biotrace TM	Pall Corporation (Estados Unidos)

⁷ Estos medios fueron suministrados por el Servicio Técnico de Preparación de Medios de Cultivo del Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols".

Ioduro de propidio (IP)	Life Technologies (Estados Unidos)
Películas de rayos X	Konica Minolta S.A. (España)
- Albúmina de suero bovino (BSA)	
- Luminol	
- Peróxido de hidrógeno	
- P-Cumárico	Sigma-Aldrich®
- DL-Ditiotreitol (DTT)	
- 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA)	
- 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetra-zol (MTT)	

7.4.2. Ensayos *in vivo*

7.4.2.1. Animales y estabulación

Se han utilizado ratones hembra de fenotipo silvestre de la cepa C57BL/6J de 3 a 3,5 meses de edad. Los animales se mantuvieron en habitaciones con temperatura constante ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), humedad ambiental de 40-70%, ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y alimentación *ad-libitum* con dieta peletizada (SAFE diets R04). La manipulación de los ratones se realizó de acuerdo con la normativa de la Comunidad Europea sobre el uso de animales de experimentación (86/609/EEC) y los protocolos experimentales se aprobaron por el Comité Ético de Experimentación Animal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

7.4.2.2. Inducción de peritonitis aguda en ratón y análisis de poblaciones celulares mediante citometría de flujo

La peritonitis aguda en el ratón se indujo mediante la inyección intraperitoneal de LPS. El inyectable de LPS se preparó fresco a una concentración de 0,06 mg/ml en suero salino estéril y se inyectaron 0,5 ml en el ratón. De la misma manera, se inyectaron los COS (0.6 mg/ml en suero salino estéril) por sí solos, y mezclados con LPS (a las concentraciones mencionadas) a otros grupos de ratones. Cada grupo estaba formado por 6 ratones ($n=6$). A las 24 horas de inducir la peritonitis se sacrificaron los animales con CO_2 y se le realizó un lavado de la cavidad peritoneal con 10 ml de PBS. Se masajeó la cavidad durante unos 30 segundos tras los que se recogió el exudado celular. Seguidamente se centrifugaron las células durante 5 minutos a 1200 rpm, se resuspendieron en 100 μl de PBS y se incubaron junto con el anticuerpo anti-Gr1 (Ly6C/G) FITC (marcador de neutrófilos) a una concentración final de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con PBS, se resuspendieron en 300 μl de PBS, se le añadieron 30 μl de bolas de conteo Perfect-Count Microesferas™ (Cytognos S. L., Salamanca, España) y se analizaron con el citómetro de flujo FC

500 MPL (Beckman Coulter, Estados Unidos, Servicio Interdepartamental de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid).

7.4.3. Ensayos *in vitro*

7.4.3.1. Cultivo de macrófagos Raw 264.7

Se utilizaron macrófagos peritoneales murinos de la línea celular establecida Raw 264.7. Estos se mantuvieron en una atmósfera de 95% aire y 5% CO₂ a 37°C en medio de cultivo DMEM-HEPES suplementado con 10% (v/v) de FBS inactivado por calor, 10 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 250 ng/ml de fungizona y de gentamicina.

7.4.3.2. Ensayo de citotoxicidad

Este ensayo se realiza para cuantificar la viabilidad celular y está basado en método propuesto por Hansen *et al.*, (1989). El MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) es una sal amarilla hidrosoluble que se metaboliza por la enzima succinato-deshidrogenasa de las mitocondrias de células metabólicamente activas, transformándose en formazán, una sal azul insoluble que se acumula dentro de las células. Al lisar las células con DMSO, el formazán también se solubiliza y el medio se torna azul, de diferente intensidad según la cantidad de células vivas que hayan quedado tras finalizar el tratamiento.

Para llevar a cabo este ensayo se plantaron 4x10⁴ células por pocillo en DMEM-HEPES 10% FBS, en una microplaca de cultivo celular p96 y se incubaron toda la noche en el incubador a 37°C y 5% CO₂. Al día siguiente, se retiró el medio de cultivo y se añadió medio nuevo, el cual contenía LPS (0,3 µg/ml) o COS (0,2; 0,5; 2 y 5 mg/ml) o ambos compuestos, y se incubó la placa durante 5 horas a 37°C, 5% CO₂. Transcurrido este tiempo, se retiró nuevamente el medio de cultivo y se sustituyó por medio nuevo que contenía 5 mg/ml de MTT, y se incubó la placa a 37°C, 5% CO₂ durante 4 horas. Finalmente, se retiró el medio y se lisaron las células con DMSO. A continuación se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Sinergy™ HT (BIOTEK, Reino Unido) y se calculó el porcentaje de viabilidad de las células en cada pocillo con tratamiento refiriéndolo a la viabilidad de las células en los pocillos sin ningún tratamiento. Los ensayos se realizaron por triplicado.

7.4.3.3. Estimulación *in vitro* con LPS y/o COS e inmunodetección de proteínas (Western Blot)

Para llevar a cabo la detección de proteínas implicadas en la señalización temprana del proceso inflamatorio, se realizaron estímulos de 30 minutos con LPS y con cada uno de los COS solos o con LPS. Para ello se plantaron 10^6 células en medio de cultivo DMEM-HEPES 0,1% FBS por pocillo en placas de cultivo p6 y se incubaron toda la noche en el incubador a 37°C y 5% CO₂. Al día siguiente, el medio existente se suplementó con los diferentes estímulos: 0,3 µg/ml de LPS, 2 mg/ml de COS, y ambos juntos. Transcurridos los 30 minutos, se aspiró el medio, se lavó una vez con PBS frío y se guardó la placa en un congelador a -80°C con objeto de que todas las células parasen su metabolismo a la vez.

Para preparar el extracto de proteínas, se añadieron 100 µl de tampón de lisis a cada pocillo y se recogieron las células lisadas en tubos eppendorf. Este extracto celular se centrifugó a 4°C durante 20 minutos a 14000 rpm en una centrífuga Mikro 22 R (Hettich Centrifuge, Reino Unido) y se reservó el sobrenadante para llevar a cabo la cuantificación de proteínas totales mediante el método del ácido bincocínico (BCA) utilizando un kit de ensayo de proteínas Pierce™ BCA (Life Technologies, Estados Unidos). Una vez cuantificados los extractos, se prepararon 30 µg de proteína junto con el tampón de carga Laemmli (5/1 v/v) en condiciones desnaturalizantes/reductoras. Se hirvieron 4 minutos a 96°C para la posterior separación de proteínas según su tamaño molecular en geles al 9% de poliacrilamida SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) y estas se bloquearon con 5% de leche semidesnatada en TTBS durante una hora en agitación. A continuación las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes en TTBS con 5% de BSA y 0,025% de azida sódica durante toda la noche a 4°C en agitación. Tras 2 lavados sucesivos de 16 minutos con TTBS, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa en TTBS con 1% de leche durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Tras 3 lavados sucesivos con TTBS más un lavado con TBS de 10 minutos, la presencia de los distintos antígenos se detectó mediante un método quimioluminiscente (ECL). Finalmente las membranas lavadas se incubaron con ECL durante 3 minutos y se

revelaron utilizando películas de rayos X. La señal se cuantificó mediante densitometría con el programa informático ImageJ⁸.

7.4.3.4. Estimulación precedida de incubación con inhibidores

En los ensayos en los que se usaron estas drogas, la adición de estímulos (LPS y COS) se realizó, tras una pre-incubación de 30 y 45 min con sulfato de polimixina B (1 µg/ml) o citocalasina B (10 µg/ml) respectivamente, en las mismas condiciones descritas en el apartado 7.4.3.3. de este capítulo.

7.4.3.5. Detección de especies reactivas del oxígeno

La detección del nivel de especies reactivas del oxígeno (ROS) intracelular se llevó a cabo mediante el método descrito por Engelmann *et al.*, (2005), basado en la oxidación del sustrato 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA). Este es un fluorocromo hidrofóbico que difunde a través de la membrana celular al citoplasma, donde es desacetilado por esterasas intracelulares a DCFH (2',7'-diclorofluoresceína), compuesto no fluorescente. El DCFH es oxidado rápidamente por las ROS presentes intracelularmente o que se hayan generado como consecuencia de un daño oxidativo, formándose diclorofluoresceína (DCF), compuesto fluorescente que puede ser excitado a 485 nm, emitiendo señal a 528 nm, cuya intensidad se puede detectar por citometría de flujo.

Se plantaron 4×10^5 células por pocillo en DMEM-HEPES 10% FBS, en una microplaca de cultivos p12 y se incubaron durante 6 horas en el incubador a 37°C y 5% CO₂. A continuación se añadió al medio H₂O₂ (500 µM) como estímulo positivo o 2 mg/ml de COS, y se incubaron durante 18 horas en las mismas condiciones. Transcurrido este periodo, se retiró el medio de cultivo, se añadió tripsina para levantar las células, y tras centrifugar durante 5 minutos a 1200 rpm, las células se pasaron a tubos de citómetro a los que se añadió 10 µM de DCFH-DA disuelto en PBS. Estos se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 30 minutos. En el minuto 25 se añadió ioduro de propidio 2 µM, para distinguir células vivas de muertas, y las muestras se analizaron con el citómetro de flujo FC 500 MPL (Beckman Coulter, Estados Unidos, Servicio Interdepartamental de Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid).

⁸ <http://imagej.nih.gov/ij/>

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresan como la media aritmética, más o menos el error estándar de la media (SD). El análisis de la significancia estadística entre la media de los grupos de estudio se realizó mediante la prueba estadística T de Student, utilizando el programa Microsoft Excel 2013 (Licencia de la UCM). Los valores se asumieron como estadísticamente significativos cuando el p-valor fue inferior a 0,05 ($p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **, $p < 0,001$ ***).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La estructura que presentan los COS se encuentra fuertemente ligada a las condiciones empleadas en los procesos de despolimerización del quitosano, así como a las características fisicoquímicas del polímero, principalmente a su grado de acetilación y a su peso molecular promedio, las cuales a su vez van a definir las propiedades biológicas que presentan estos oligosacáridos.

La búsqueda de relaciones entre las características fisicoquímicas y las propiedades biológicas que ayuden a esclarecer los mecanismos de acción de los COS, es el principal objetivo de este trabajo de investigación. Para ello, se ha obtenido una amplia gama de COS que difieran en sus características fisicoquímicas empleando y estudiando diferentes procesos de obtención.

1. CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LOS QUITOSANOS

Las dos muestras de quitosano originales de las que se partió (QsA y QsB) para la posterior obtención de COS, se purificaron y se caracterizaron según se detalla en el apartado 3 y 4 de la metodología. Cada quitosano se utilizó para obtener COS mediante tres procesos diferentes, los cuales han sido anteriormente descritos y nombrados como P1, P2 y P3 (véase página tal).

Tabla IV.1. Características fisicoquímicas de los quitosanos.

Quitosanos	Humedad (%)	Materia inorgánica (%)	Viscosidad intrínseca $[\eta]$ (ml/g)	\overline{M}_w (kDa)	PDI	DA (%)
QsA	9,09	0,28	394,97	89,49	1,50	17
QsB	9,87	0,68	443,01	114,74	1,46	16

1.1. Contenido en humedad y en impurezas

En primer lugar se determinó el contenido en humedad y en materia inorgánica, parámetros necesarios para poder comparar de forma adecuada los resultados obtenidos a partir de diferentes quitosanos. El contenido en humedad fue inferior al 10 % y el contenido en materia inorgánica fue inferior al 1 % en ambas muestras de quitosano original (Tabla IV.1). Estos parámetros afectan directamente a la concentración efectiva del polímero en una disolución dada, complicando la reproducibilidad de experimentos y la comparación de resultados si no se suministra esta información.

El contenido en humedad afecta de manera significativa al peso real del polímero en solución, mientras que el contenido en materia inorgánica refleja la eficacia del proceso de desmineralización empleado en la obtención del quitosano. A pesar de que las Normas ASTM F2103 (2007) (del inglés *American Society for Testing and Materials*), describen y estipulan los procedimientos para su determinación, no establecen unos valores máximos permitidos. Por lo general, para el contenido en humedad se considera común estipular que este debe ser inferior al 10-15 %, y para el contenido en materia inorgánica inferior al 1,0 %, según las especificaciones de calidad de algunas casas comerciales.

El contenido en materia inorgánica reflejó en su mayoría la cantidad total de carbonatos y silicatos presentes en las muestras de quitosano. La composición de estas sales dependerá de la fuente de procedencia de la quitina y del tratamiento industrial aplicado hasta la obtención del quitosano (Aranaz *et al.*, 2009). Tanto el QsA como el QsB fueron suministrados por casas comerciales y según las especificaciones del producto, ambos se obtuvieron mediante desacetilación homogénea de la quitina. En el caso del QsA, la quitina era procedente de *Pandalus borealis* (Krøyer, 1838), un crustáceo decápodo comúnmente llamado tipo camarón que puede llegar a vivir hasta 8 años. En el caso del QsB, la quitina era procedente de *Lithodes antarcticus* (Molina, 1782), sinónimo de *Lithodes santolla*, un crustáceo también decápodo comúnmente llamado tipo centollo puede llegar a vivir hasta 14 años (Wyngaard *et al.*, 2000). Aunque ambas especies desarrollan su ciclo vital en aguas frías (2-15°C), *L. antarcticus* presenta un exoesqueleto más mineralizado, y por tanto más rígido, que *P. borealis*. Este hecho se vio reflejado en los valores residuales de materia inorgánica, en su mayoría sales de carbonato, determinados para los quitosanos de ambas especies (0,28 % respecto a 0,68 %), tras haberse producido la desmineralización del exoesqueleto, proceso necesario para aislar la quitina.

Varios autores han demostrado que las diferencias existentes entre especies de crustáceos y el proceso de aislamiento de quitina, conllevan una variación en la morfología o composición de la quitina, lo cual conduce a un comportamiento diferente durante la desacetilación (Chang *et al.*, 1997; Lamarque *et al.*, 2004). Posteriormente, se comprobó que las características fisicoquímicas de la quitina, y por tanto del quitosano, vienen determinadas por el hábitat del crustáceo así como por la relación filogenética entre especies (Galed Ceresuela, 2006), habiéndose encontrado similitudes entre procesos de desacetilación y quitinas de especies emparentadas evolutivamente respecto a otras menos emparentadas.

1.2. Viscosidad intrínseca

Se determinó la viscosidad intrínseca $[\eta]$, de cada solución de quitosano, y se obtuvo un valor mayor para el QsB que para el QsA (Tabla IV.1). La $[\eta]$ es una propiedad que viene determinada por la longitud y la conformación de las cadenas de quitosano, las cuales adquieren una forma de hélice extendida cuando se encuentran en solución, y aporta información sobre el \overline{M}_v del polímero (Weinhold *et al.*, 2009a). Esta técnica requiere una correcta elección del solvente a emplear, con objeto de evitar la formación de agregados y las posibles interacciones electrostáticas con el disolvente, debido a las condiciones ácidas en la que se encuentra disuelto. En este trabajo, se utilizó un tampón compuesto por 0,3 M CH_3COOH /0,2 M CH_3COONa (pH 4,5) el cual omite la formación de agregados en la disolución así como cualquier efecto electrostático debido a las condiciones ácidas (Rinaudo *et al.*, 1993). Por tanto, a partir de los valores de $[\eta]$ obtenidos, se dedujo que las moléculas que componían QsB podrían presentar mayor \overline{M}_w que las de QsA.

1.3. Grado de acetilación

El DA representa la cantidad proporcional de unidades de N-acetilglucosamina (A) respecto a unidades de N-glucosamina (D). Los valores de DA de los quitosanos de partida se determinaron mediante ^1H -RMN y fueron similares (17 % y 16 % respectivamente para QsA y QsB) (Tabla IV.1). Aunque esta técnica conlleva un error de ± 5 % sigue siendo una de las más sensibles y exactas para determinar este parámetro (Kasaai, 2010). La Figura IV.1 muestra el espectro de ^1H -RMN del QsA, en el cual se apreciaron las señales de desplazamiento químico de los protones para la molécula de quitosano, valores similares a los encontrados en la bibliografía (Hirai *et al.*, 1991). El conocimiento de este parámetro es fundamental puesto que influirá directamente en su solubilidad así como en la densidad de cargas del polímero en solución.

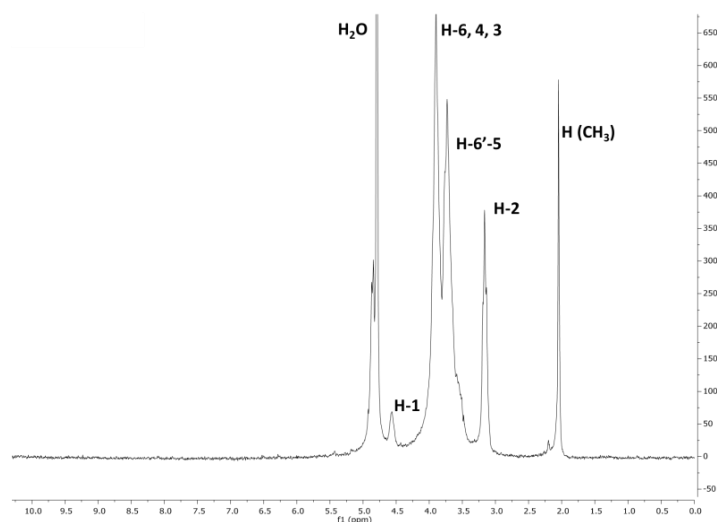


Figura IV.1. Espectro de ^1H -RMN del quitosano de partida QsA. El espectro de ^1H -RMN correspondiente al QsB se adjunta en el Anexo I.

1.4. Peso molecular promedio

Mediante cromatografía de exclusión molecular de alta presión (HP-SEC) se determinó el peso molecular promedio en peso (\overline{M}_w), así como el índice de polidispersidad (PDI) del QsA y QsB (Tabla IV.1). Se obtuvo un valor de \overline{M}_w superior para QsB (114,74 kDa) que para QsA (89,49 kDa), y ambos polímeros mostraron una polidispersidad similar. Esta técnica aporta información acerca de la distribución del peso molecular promedio del quitosano, así como de su polidispersidad, definida esta como la relación existente entre el peso molecular promedio en peso (\overline{M}_w) y el número de cadenas con un peso molecular específico (peso molecular promedio en número, M_n). El QsB por tanto estaba constituido por cadenas de mayor M_w que el QsA, resultado que coincidió con la mayor $[\eta]$ presentada por el QsB, como se había observado previamente.

La dimensión de las cadenas del polímero en solución está relacionada directamente con el volumen hidrodinámico que ocupan así como con la viscosidad, y dependen directamente del carácter semirrígido de las moléculas del polisacárido (Rinaudo, 2006). La amplitud de la distribución de pesos moleculares influirá sobre las propiedades del polímero, y en ambos casos se encontró que la polidispersidad fue igual o inferior a 1,5 (Tabla IV.1). Se considera que un valor de PDI comprendido entre 1,5 y 2 para polímeros de quitosano no se relaciona con una alta polidispersidad en este tipo de muestras (Nguyen *et al.*, 2009).

2. CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS QUITOOLIGOSACÁRIDOS Y DE LOS QUITOSANOS MODIFICADOS

Una vez caracterizados los quitosanos de partida, se llevaron a cabo tres procesos de producción de COS con el objetivo de obtener productos de hidrólisis con diferentes características fisicoquímicas. En el primer proceso (P1) se partió directamente de QsA y QsB, los cuales se hidrolizaron enzimáticamente con quitosanasa EC1.2.3.132. En el segundo proceso (P2) se modificó el M_w de QsA y QsB mediante hidrólisis ácida, y el producto resultante (QsA-Q y QsB-Q) se hidrolizó con la misma quitosanasa empleada en P1. En el tercer proceso (P3) se modificó el DA de QsA y QsB mediante reacetilación, y el producto resultante (QsA-R o QsB-R) se hidrolizó con la misma quitosanasa empleada en P1. No se observaron diferencias significativas entre los procesos respecto al rendimiento de obtención de cada fracción de COS, obteniéndose un rendimiento inferior a medida que disminuía el tamaño de corte de M_w de las fracciones de COS (entre 6-10% de rendimiento).

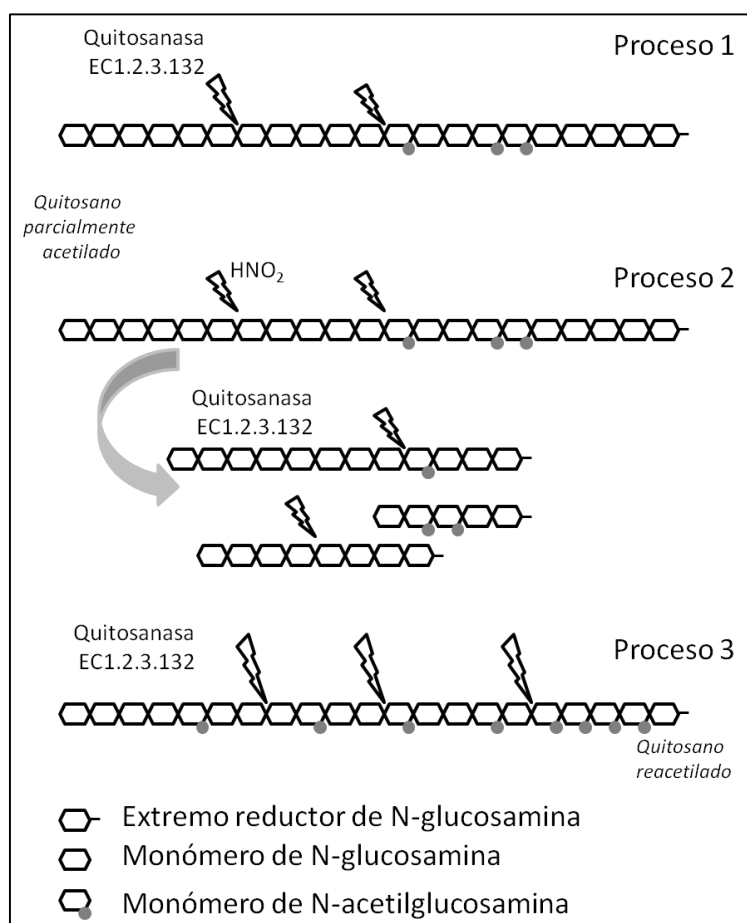


Figura IV.2. Esquema representativo de los procesos de obtención de COS.

2.1. Determinación del grado de acetilación y análisis estructural

Todos los COS obtenidos mediante los tres procesos, así como los quitosanos modificados empleados para su obtención (QsA-Q, QsA-R, QsB-Q, QsB-R), se analizaron mediante ^1H -RMN para determinar su DA (Tabla IV.2). Además los espectros de ^1H -RMN, permitieron identificar posibles modificaciones en la estructura debido a los procesos empleados.

Tabla IV.2. Grado de acetilación (%) de los quitosanos de partida, de los quitosanos modificados y de los COS obtenidos mediante P1, P2 y P3.

Muestra	P1	P2	P3	Muestra	P1	P2	P3
QsA	17			QsB	16		
QsA-Q		17		QsB-Q		14	
QsA-R			40	QsB-R			43
COS 1	14	15	46	COS 1	14	10	41
COS 2	13	11	47	COS 2	11	9	39
COS 3	12	13	42	COS 3	10	10	31

Proceso 1

Al igual que en los espectros de ^1H -RMN de los quitosanos de partida (Fig. IV.1), los espectros de los COS obtenidos a partir de ambos quitosanos mostraron las señales de desplazamiento químico de los protones H1-H6 del monómero de N-glucosamina concordantes con los valores descritos en la literatura (Hirai *et al.*, 1991). Los valores de DA de los COS procedentes de P1 fueron ligeramente inferiores a los valores de DA de los quitosanos originales (Tabla IV.2).

La quitosanasas E.C.1.2.3.132 utilizada en este proceso hidroliza quitosanos parcialmente acetilados y es ampliamente utilizada para la obtención de COS bioactivos (Kim *et al.*, 2005). Esta glicosil endohidrolasa perteneciente a la subclase III, hidroliza específicamente enlaces O-glicosídicos entre dos unidades de N-glucosamina (D-D) y entre una N-glucosamina y N-acetilglucosamina (D-A) generando nuevos extremos reductores formados por unidades desacetiladas (Ohtakara *et al.*, 1988). Se ha descrito que los protones del carbono anomérico del extremo reductor resuenan a 5,4 ppm para la unidad D y a 5,1 ppm para la unidad A (Ishiguro *et al.*, 1992), mientras que para las unidades internas resuenan a 4,9 y 4,6 ppm respectivamente (Vårum *et al.*, 1991a).

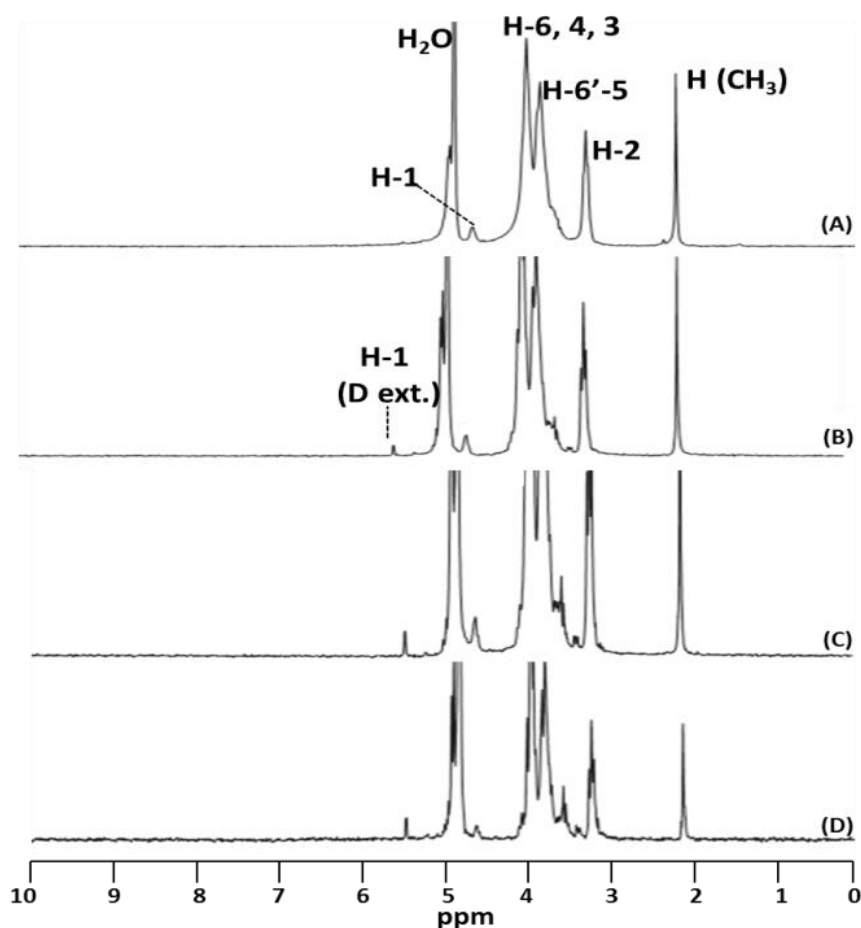


Figura IV.3. Espectros de ^1H -RMN de los COS obtenidos mediante P1 a partir de QsB. (A) Quitosano original QsB; (B) COS 1 (M_w 30-10 kDa); (C) COS 2 (M_w 10-5 kDa); (D) COS 3 (M_w < 5kDa). Los espectros de los COS obtenidos mediante P1 a partir de QsA se muestran en el Anexo I.

Los espectros de los COS obtenidos mediante P1 (Fig. IV.3) mostraron la señal correspondiente al protón del carbono anomérico de unidades D de los extremos reductores de las moléculas de quitosano, a un desplazamiento químico de 5,4 ppm, y esta señal apareció más intensa a medida que disminuía el intervalo de tamaño de corte de M_w de las fracciones de COS, demostrándose, la actuación efectiva de la enzima. Fukamizo *et al.*, (1995) también estudiaron el comportamiento enzimático de la quitosanasa de *Streptomyces* mediante ^1H -RMN, y describieron que uno de los subsitios adyacentes al sitio catalítico mostraba extremadamente poca afinidad por unidades A, pudiéndose unir solo a monómeros D, mientras que el otro subsitio adyacente mostraba más flexibilidad, uniéndose a unidades D o A indistintamente. Por ello, este comportamiento explicaría la aparición de un mayor número de extremos reductores ocupados por unidades D en los productos de hidrólisis generados por la acción de esta enzima.

Proceso 2

En el P2 se modificó el M_w de QsA y QsB mediante hidrólisis ácida, obteniéndose LMWC (QsA-Q y QsB-Q), los cuales se hidrolizaron enzimáticamente para obtener COS. En el caso del QsA-Q no se observó modificación del valor de DA promedio (17 %) respecto al quitosano de partida. Por otro lado, para el QsB-Q se obtuvo un valor de DA promedio ligeramente inferior (14 %) respecto al quitosano original. Los valores de DA obtenidos para los COS procedentes de P2 fueron ligeramente inferiores a los respectivos valores de DA de cada quitosano original (Tabla IV.2).

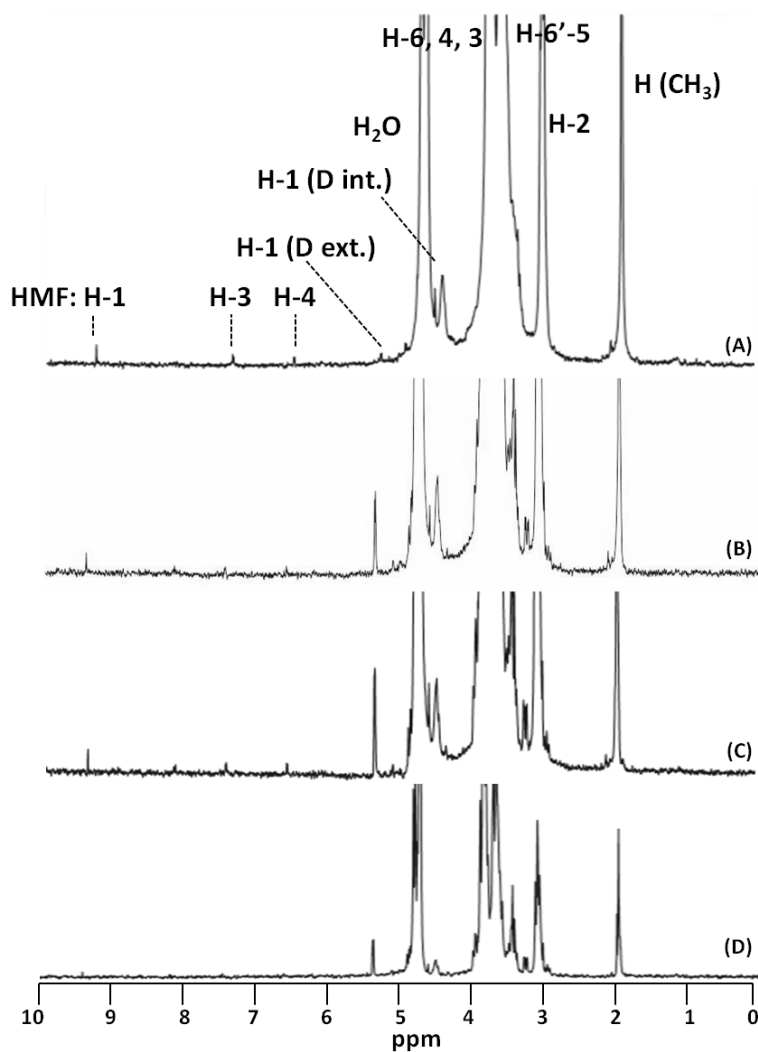


Figura IV.4. Espectros de ^1H -RMN de los COS obtenidos mediante P2 a partir de QsB. (A) Quitosano original QsB-Q; (B) COS 1 (M_w 30-10 kDa); (C) COS 2 (M_w 10-5 kDa); (D) COS 3 (M_w < 5 kDa). Los espectros de los COS obtenidos mediante P2 a partir de QsA se muestran en el Anexo I.

En los quitosanos hidrolizados químicamente (QsA-Q y QsB-Q) se observó que se mantenían las señales de todos los protones asignados a la estructura del quitosano (Fig. IV.4, respectivamente). Apareció la señal correspondiente al protón del carbono anomérico de

unidades D situadas en los extremos reductores, a un desplazamiento químico de 5,4 ppm. Asimismo, aparecieron tres nuevas señales a un desplazamiento químico comprendido entre 6,5 y 9,5 ppm.

La señal a un desplazamiento químico de 5,4 ppm aparece como consecuencia de este tipo de hidrólisis ácida, ya que los enlaces O-glicosídicos que se encuentran entre D-D y D-A son más susceptibles de ser hidrolizados por ácido nitroso que los enlaces entre A-A y A-D (Tømmeraas *et al.*, 2001). Por este motivo se generaron nuevos extremos reductores ocupados por unidades D. La hidrólisis con ácido nitroso es una reacción homogénea que sigue una cinética de primer orden, en la que el número de enlaces hidrolizados guarda una relación estequiométrica con la proporción de ácido nitroso, y cuyo mecanismo implica la desaminación de unidades D de los extremos reductores y con ello la formación de moléculas de 2,5-anhidro-D-manosa (AM) (Allan *et al.*, 1995b). Estas moléculas son más reactivas que las unidades D, por lo que en determinadas condiciones tienden a reaccionar con el grupo amino libre de la unidad D adyacente, dando lugar a la formación de Bases de Schiff, imina estable y muy reactiva que puede dar lugar a la formación de 5-hidroximetil-2-furfural (HMF), producto común de la reacción de Maillard (Tømmeraas *et al.*, 2001). Según estos autores, los protones H-1, H-3 y H-4 del HMF resuenan a un desplazamiento químico de 9,43 ppm, 7,51 ppm y 6,66 ppm respectivamente, cuyas señales se pudieron observar en los espectros de los quitosanos QsA-Q y QsB-Q, así como en todos los COS obtenidos mediante P2, siendo estas señales menos intensas en los COS de menor M_w (COS 3) (Fig. IV.4). Este hecho indicó que las cantidades generadas de HMF como consecuencia del proceso llevado a cabo (P2) tendieron a permanecer en las fracciones de mayor M_w (COS 1 y COS 2).

La segunda etapa de este P2 consistió en una hidrólisis enzimática empleando la misma quitosanasas que en P1. Como se ha comentado anteriormente, esta quitosanasas hidroliza específicamente enlaces O-glicosídicos entre unidades D-D y D-A, generando mayor cantidad de extremos reductores formados por unidades D a medida que se van formando moléculas de menor M_w . Puesto que con la doble despolimerización, de distinta naturaleza, se hidrolizaron el mismo tipo de enlaces, se generó una mayor cantidad de extremos reductores de unidades D. Este hecho se vio reflejado en los espectros de ^1H -RMN con una mayor intensidad del pico a 5,4 ppm en los COS obtenidos mediante P2 (Fig. IV.4) respecto a los obtenidos mediante P1 (Fig. IV.3). Además, se pudo observar claramente como esta señal era mucho más intensa en los COS, los cuales se sometieron a la doble hidrólisis, que en el sustrato QsB-Q, el solo se sometió a hidrólisis ácida.

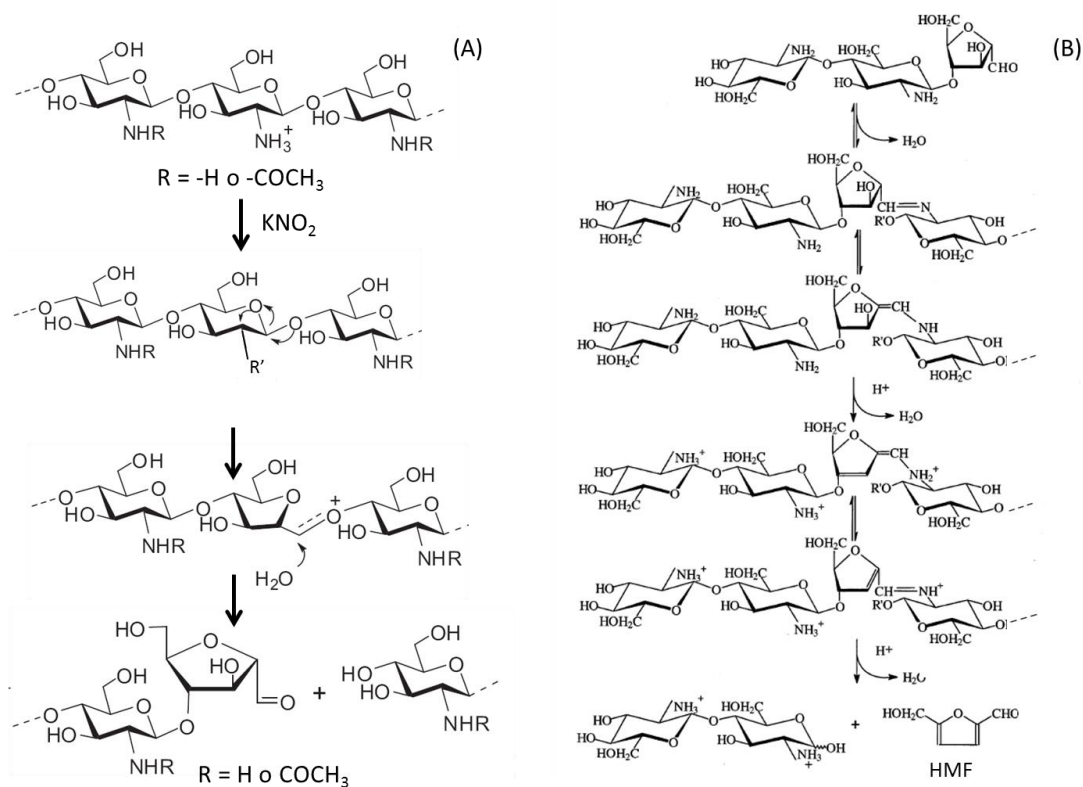


Figura IV.5. Esquema de la degradación del quitosano con ácido nitroso. (A) Esquema del mecanismo de formación de AM durante la hidrólisis con ácido nitroso. La reacción implica la desaminación de una unidad D con el ácido nitroso a través de la contracción del anillo para formar AM en el extremo reductor naciente. Fuente: Tømmerraas *et al.*, 2001; Hirano *et al.*, 1985; Horton *et al.*, 1973. (B) Esquema del mecanismo propuesto para la formación de Base de Schiff en el nuevo extremo reductor de AM a través de la reacción con el grupo amino libre de otro oligómero de quitosano, dando origen a la formación de HMF tras la eliminación de una molécula de agua. Fuente: Tømmerraas *et al.*, 2001.

Por tanto, se podría establecer que tras este proceso de doble hidrólisis, la formación de moléculas de AM en el nuevo extremo reductor y la mayor cantidad de extremos reductores de unidades D favorecieron la formación de HMF durante el proceso de liofilización llevado a cabo durante la purificación de los COS, como ya describían (Tømmerraas *et al.*, 2001). Durante el proceso de liofilización, la evaporación del agua y del ácido acético que contiene el tampón de disolución de los COS, provocaría un cambio del pH del medio por encima del pK_a del quitosano (~ 6.5) y el grupo amino quedaría desprotonado generándose un fuerte nucleófilo, el cual puede reaccionar con el grupo aldehído del extremo reductor, produciéndose una unión reversible con la consiguiente liberación de una molécula de agua (Anthonsen *et al.*, 1995; Domard, 1987).

Por otro lado, la menor intensidad de las señales de los protones asignados al HMF y del H-1 del carbono anomérico de los extremos reductores de unidades D (5,4 ppm) que se observó en

los COS 3 (Fig. IV.4D) respecto a las otras fracciones de este mismo proceso, reflejaron la menor abundancia de estos. Este hecho indicaría la posibilidad de que parte de estos compuestos estuviesen interviniendo en reacciones de etapas más avanzadas de la Reacción de Maillard (Zeng *et al.*, 2007; Tomas *et al.*, 2005). El bajo grado de polimerización de los COS 3 podría estar favoreciendo un mayor avance de la Reacción de Maillard, ya que disminuiría el efecto de impedimento estérico entre el grupo amino libre y el extremo reductor (Yue, 2014).

La presencia de compuestos fluorescentes en un intervalo entre $\lambda_{EX} = 340 - 370$ nm y $\lambda_{EM} = 400 - 440$ nm manifiesta la presencia de productos avanzados de la Reacción de Maillard, también llamados productos de glicación avanzada o AGEs (del inglés *Advanced Glycation End Products*) (Jung *et al.*, 2014; Morales *et al.*, 2001). En la Figura IV.6 se muestran los espectros de fluorescencia obtenidos para los COS de P2 procedentes de QsA y QsB, en los que se observaron modificaciones en los máximos de emisión entre 400 - 440 nm. En todos los espectros se pudo observar un máximo de fluorescencia a 410 nm debido a la presencia de compuestos de naturaleza fluorescente. Destacó una mayor intensidad de estos productos de reacción en el caso de los COS 3, siendo más intenso en el procedente de QsA (Fig. IV.6A), justificándose así la menor intensidad de las señales de los protones asignados al HMF y del H-1 de los extremos reductores de unidades D obtenidas en los espectros de ^1H -RMN (Fig. IV.4D), como consecuencia de un mayor avance de la reacción.

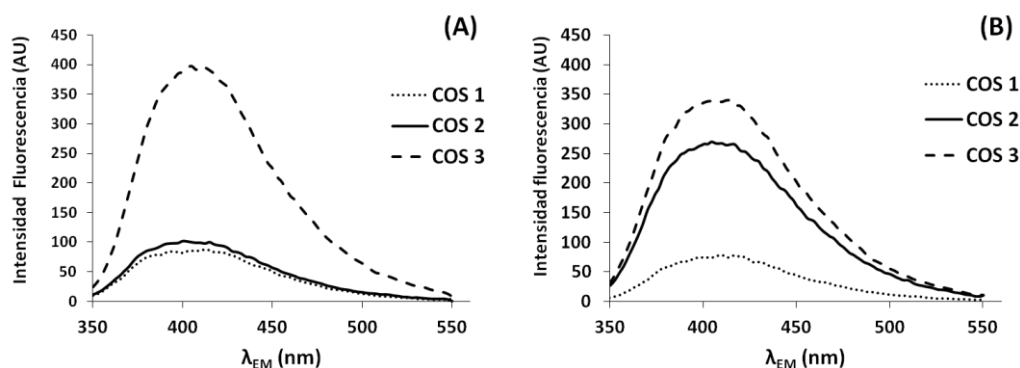


Figura IV.6. Espectros de fluorescencia obtenidos para los COS procedentes de QsA (A) y de QsB (B) mediante P2. Se representa la fluorescencia de los productos de la Reacción de Maillard presentes en la fracción de COS.

Si se comparan los COS obtenidos mediante P1 y P2 a partir de QsA y QsB en términos de DA (Tabla IV.2), no se observaron diferencias entre ambos procesos, exceptuando una disminución del valor del DA en los COS 1 cuando estos procedían de QsB (14 % y 10 % respectivamente para COS 1 P1 y COS 1 P2). Dado que la posible desacetilación que pudiera

producirse como consecuencia de la hidrólisis ácida se considera despreciable (Tømmerraas *et al.*, 2001), el hecho de haber introducido este tipo de hidrólisis ácida previamente a la despolimerización enzimática parece que no afectó al valor de DA promedio de los productos obtenidos mediante este P2. Sin embargo, este tipo de proceso afectaría a la composición de la muestra, en cuanto a la mayor abundancia de extremos reductores de unidades de N-glucosamina y a la presencia de productos de la Reacción de Maillard.

Proceso 3

En el último proceso llevado a cabo, se modificó el DA de QsA y QsB mediante N-acetilación del polímero con anhídrido acético, obteniéndose quitosanos con un DA superior (QsA-R y QsB-R), los cuales se hidrolizaron enzimáticamente. El DA obtenido fue 40 % y 43 % respectivamente para QsA-R y QsB-R. Este resultado demostró que la reacción de N-acetilación de los grupo amino libres de las unidades D se llevó a cabo de manera efectiva. Todos los COS obtenidos mediante P3 presentaron un DA similar al DA de los quitosanos sustrato (QsA-R y QsB-R), a excepción del COS 3 P3 procedente de QsB-R, para el cual se obtuvo un DA inferior al de su sustrato (10 % inferior) (Tabla IV.2).

En los espectros de los quitosanos reacetilados (QsA-R y QsB-R) se pudo observar que se mantenían las señales de todos los protones asignados a la estructura del quitosano (Fig. IV.7A). Respecto a las muestras de partida (QsA y QsB), se observó una mayor intensidad del pico que resuena a un desplazamiento químico de 2 ppm, asignado a los protones del grupo acetilo, así como de la señal asignada al protón del carbono anomérico de unidades A internas (4,6 ppm), como consecuencia de una mayor proporción de estas unidades acetiladas a lo largo del polisacárido.

La segunda parte de este P3 consistió en una hidrólisis enzimática empleando la misma quitosanas que en P1, que como se ha comentado, produjo un aumento de extremos reductores ocupados por unidades D. Este hecho se observó de nuevo, en el aumento de la intensidad de la señal del protón del carbono anomérico de esta unidad (5,4 ppm), e indicó que la despolimerización enzimática se realizó de manera efectiva (Fig. IV.7). Por otro lado se observó, aunque de manera menos intensa, la señal asignada al protón del carbono anomérico de unidades A externas, a 5,1 ppm (Fig. IV.7B-D), indicando que en este proceso también se formaron este tipo de extremos reductores como consecuencia de una mayor acción

enzimática sobre enlaces O-glicosídicos entre D-A, debido al mayor DA de los quitosanos reacetilados.

Al comparar estos espectros con los espectros de los COS obtenidos a partir de P1 y P2, se observó que la abundancia de extremos reductores ocupados por unidades D en función de la intensidad de la señal encontrada a un desplazamiento químico de 5,4 ppm era menor respecto a P2, y similar respecto a P1.

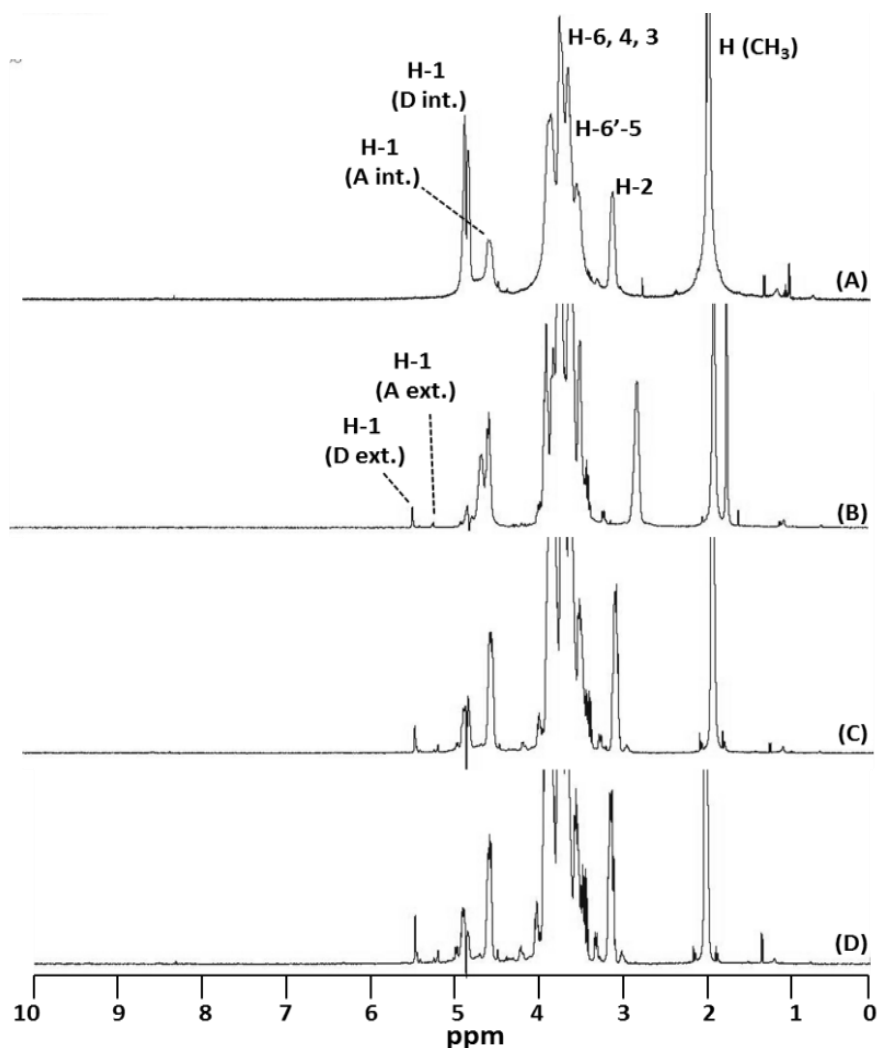


Figura IV.7. Espectros de ^1H -RMN de los COS obtenidos mediante P3 a partir de QsB. (A) Quitosano original QsB-R; (B) COS 1 (M_w 30-10 kDa); (C) COS 2 (M_w 10-5 kDa); (D) COS 3 (M_w < 5kDa). Los espectros de los COS obtenidos mediante P2 a partir de QsA se muestran en el Anexo I.

La actuación de la quitosanasa está influenciada por diferentes factores como el DA del quitosano, su solubilidad, viscosidad y concentración (Somashekar *et al.*, 1996). Esta enzima, la cual no hidroliza enlaces entre A-A (Tanabe *et al.*, 2003), necesita quitosanos parcialmente acetilados para poder actuar, y en este caso, su especificidad se vio reflejada en función del DA

del sustrato, mediante la determinación de la identidad de los extremos reductores formados tras la despolimerización.

Respecto a todos los procesos de producción de COS, en los cuales el DA varió entre 17 % y 43 %, se comprobó que la quitosanasa EC.1.2.3.132 actuó de manera efectiva, demostrando su adaptabilidad para hidrolizar quitosanos con diferentes grados de acetilación. Existen estudios que demuestran la actividad enzimática con esta quitosanasa en los cuales obtienen una hidrólisis efectiva cuando el sustrato presenta un DA entre 25 % y 35 % (Fukamizo *et al.*, 1995). Posteriormente, Mengíbar *et al.*, (2011) obtuvieron COS bioactivos a partir de quitosano con un DA de 25 % y a partir de un quitosano con un DA de 35 % (Mengíbar *et al.*, 2013). En este estudio se ha comprobado la efectividad de la enzima para hidrolizar quitosanos con un DA del 43 %.

2.2. Determinación del patrón de acetilación

Los parámetros fisicoquímicos del quitosano dependen de la fuente de procedencia de la quitina así como de las condiciones del proceso de desacetilación (Aranaz *et al.*, 2009; Lamarque *et al.* 2007), influyendo de forma importante en el patrón de distribución de acetilación del quitosano. Una vez aislada la quitina del exoesqueleto de los crustáceos, se lleva a cabo el proceso de desacetilación en condiciones homogéneas, el cual transcurre de manera aleatoria, produciendo quitosanos con un PA aleatorio (Vårum *et al.*, 1997; Kurita, 1998; Goycoolea *et al.*, 2000). El DA determinará directamente el patrón de distribución de unidades A a lo largo de las moléculas del polímero (PA), parámetro fundamental en el control del comportamiento del polímero en solución (Aiba *et al.*, 1991).

El PA de los COS se determinó mediante ^{13}C -RMN, a través de la intensidad de la señal correspondiente al C-5 del esqueleto de N-glucosamina, el cual muestra un desplazamiento químico diferente en función de los monómeros adyacentes (Weinhold *et al.*, 2009b). Se analizaron las fracciones de COS 2 procedentes de ambos quitosanos mediante los tres procesos de obtención, las cuales se correspondían con un peso molecular intermedio (M_w 10 - 5 kDa) y para las cuales se obtuvo un valor de PA comprendido entre 0,7 y 1,2 (Tabla IV.3). Todos los valores se correspondieron con un modelo de PA de distribución aleatoria (Weinhold *et al.*, 2009b). Según estos autores, la distribución de unidades A puede ser aleatoria (Bernoulli), ordenada en bloques o alternada (Fig. IV.8) y teóricamente, es un parámetro con un impacto significativo en la actividad fisicoquímica y biológica del polisacárido, ya que se

pueden encontrar quitosanos con DA y M_w similares y con un PA diferente. En base a la relación entre el valor de PA y DA según la Figura IV.8, se asignó un modelo de PA para cada muestra analizada (Tabla IV.3).

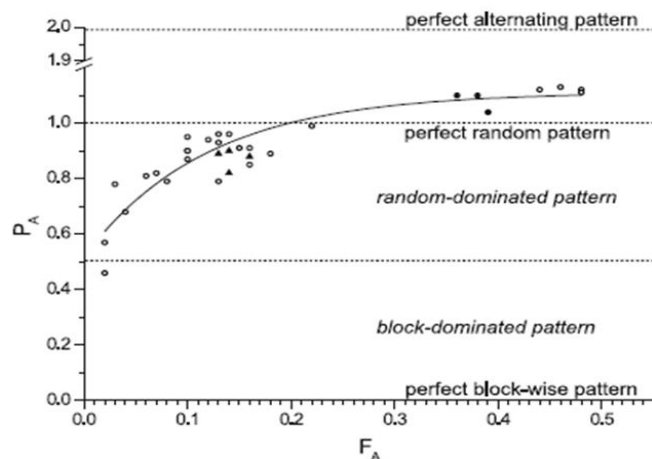


Figura IV.8. Dependencia del patrón de acetilación (PA) versus DA. La gráfica muestra tres regiones en las cuales se engloban diferentes muestras de quitosanos con DA y PA conocidos. Estas tres regiones definen tres modelos de patrón de PA: patrón dominante en bloque (0 - 0,5), patrón dominante aleatorio (0,5 - 2) y patrón perfectamente alternado (> 2). Fuente: Weinhold *et al.*, (2009b).

Tabla IV.3. Grado de acetilación (DA, %) y patrón de acetilación (PA) de los COS 2 (M_w 10-5 kDa) obtenidos mediante P1, P2 y P3.

QsA	DA (%)	PA	Modelo de patrón	QsB	DA (%)	PA	Modelo de patrón
COS 2 P1	13	0,8	<i>Dominante aleatorio</i>	COS 2 P1	11	0,7	<i>Dominant e aleatorio</i>
COS 2 P2	11	0,9	<i>Dominante aleatorio</i>	COS 2 P2	9	0,8	<i>Dominant e aleatorio</i>
COS 2 P3	47	1,1	<i>Perfecto aleatorio</i>	COS 2 P3	39	1,2	<i>Perfecto aleatorio</i>

Kumirska *et al.* (2009a) determinaron el PA de quitosanos de diferente M_w así como de los productos obtenidos a partir de su despolimerización controlada, y concluyeron que el valor del PA de los productos de hidrólisis y el de sus respectivos quitosanos de partida eran comparables, puesto que obtuvieron un valor de PA similar en ambos casos. Comprobaron que la exactitud y sensibilidad obtenida en los espectros de ^{13}C -RMN de quitosanos de bajo M_w fue superior que en quitosanos de mayor M_w . Por ello, el análisis de PA a través de los espectros

de mayor sensibilidad de ^{13}C -RMN de los COS 2 se consideró adecuado para el análisis del PA de los COS procedentes de los distintos procesos, y por tanto equiparable a los valores de PA de los quitosanos de partida.

Los espectros de ^{13}C -RMN mostraron las señales de desplazamiento químico de los carbonos concordantes con los valores de la literatura (Vårum *et al.*, 1991b), y no se observaron cambios en la estructura local del esqueleto del polímero para ninguno de los procesos estudiados (Fig. IV.9). En la Figura IV.9C se observó una mayor intensidad en la señal correspondiente al carbono del grupo acetilo debido a que esta muestra de COS 2 procedente de P3 presentó un DA superior (47 %) respecto a las otras dos muestras (correspondientes a los COS obtenidos mediante P1 y P2).

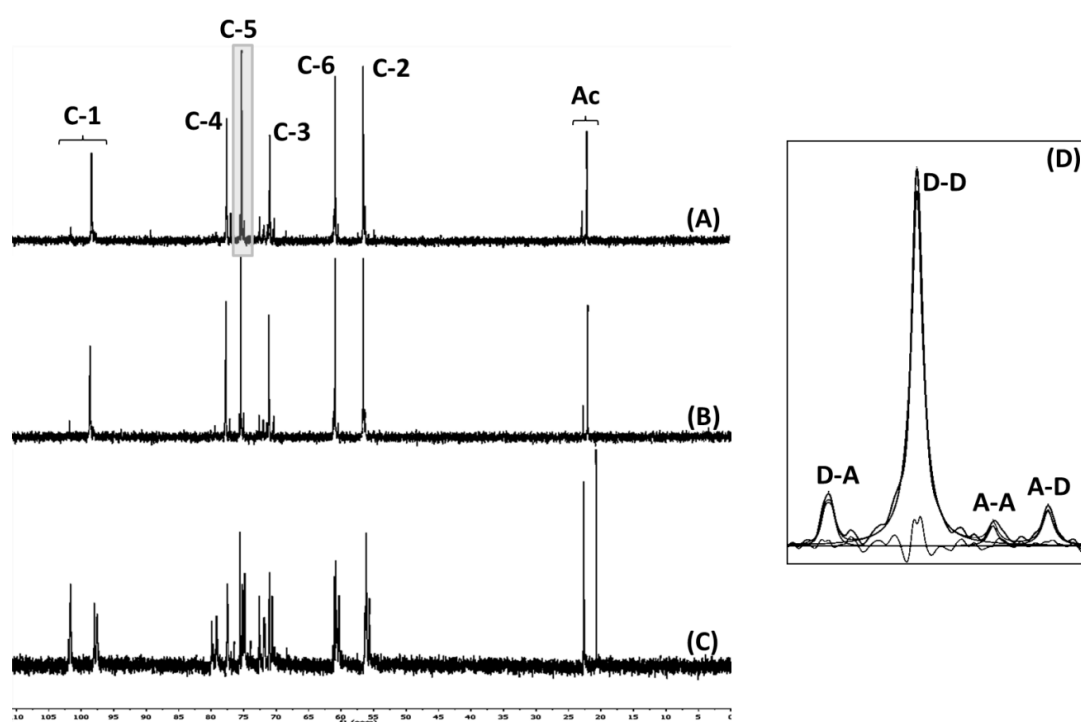


Figura IV.9. Espectros de ^{13}C -RMN de COS procedentes de QsA. (A) COS 2 P1; (B) COS 2 P2; (C) COS 2 P3; (D) Zoom de la señal correspondiente al C-5 en la que se observaron diferentes intensidades según la naturaleza de las unidades adyacentes. La asignación de las señales se ha hecho según Vårum *et al.*, (1991b) y Tømmerraas *et al.*, (2001). Los espectros de los COS obtenidos mediante P2 a partir de QsB se muestran en el Anexo I.

Como se ha descrito, el PA de las mezclas de COS dependerá de las características fisicoquímicas del quitosano de partida (DA, M_w y PA) (Jung *et al.*, 2014). Teóricamente, los polímeros de partida QsA y QsB presentaban un PA aleatorio. Teniendo en cuenta la información aportada por las casas comerciales que los suministraron, estos polímeros fueron obtenidos mediante procesos homogéneos de desacetilación de la quitina, los cuales

favorecen ese patrón de distribución aleatorio (Kurita *et al.*, 1977; Vårum *et al.*, 1996). Puesto que también se obtuvo un PA aleatorio para los COS obtenidos mediante P1, se demostró que la despolimerización con quitosanasa EC.1.2.3.132 no afectó al PA de los productos hidrolizados.

En el caso del P2, previamente a la despolimerización enzimática, se llevó a cabo una hidrólisis con ácido nitroso, reacción controlada que ocurre de manera homogénea (Allan *et al.*, 1995a). Puesto que en este proceso se obtuvieron valores de PA ligeramente superiores a los obtenidos en las muestras de P1, se demostró la tendencia hacia un PA perfectamente aleatorio cuando los COS se obtuvieron mediante este proceso.

En el caso del P3 se obtuvieron valores de PA ligeramente superiores a los obtenidos en las muestras de P1 y P2, por lo que se demostró la tendencia hacia un PA perfectamente aleatorio. El hecho de introducir un proceso homogéneo de reacetilación, no afectó al PA del polímero, obteniéndose COS con un PA perfectamente aleatorio. Este tipo de reacetilación en condiciones homogéneas conduce a la obtención de muestras con un PA aleatorio, resultando ser altamente hidrosolubles sin que tengan lugar fenómenos de agregación (Aiba 1992; 1994).

2.3. Determinación del peso molecular promedio

El \overline{M}_w del quitosano afecta a la flexibilidad de las cadenas en solución y repercute a su afinidad por la enzima en reacciones de hidrólisis enzimática (Li *et al.*, 2007). En los procesos de producción descritos, se separaron y purificaron diferentes fracciones de COS en función del rango de tamaño de corte de M_w . Posteriormente estas fracciones, así como los quitosanos modificados empleados en los distintos procesos, se analizaron mediante HP-SEC, una de las técnicas más comunes para determinar el \overline{M}_w y las distribuciones de pesos moleculares en polímeros (Brugnerotto *et al.*, 2001b).

En la Figura IV.10 se observa el desplazamiento de los picos cromatográficos, correspondientes a los distintos productos de hidrólisis, hacia mayores volúmenes de elución. Este desplazamiento se produjo en función de la disminución del M_w de los COS, comprobándose que la separación mediante UF tangencial se realizó de manera efectiva. Estos resultados demostraron por tanto una hidrólisis efectiva de la quitosanasa EC.1.2.3.132 sobre QsA y QsB, produciéndose un descenso del M_w inicial, así como la efectividad de los procesos de obtención de COS llevados a cabo.

En la Figura IV.10A se observó el desplazamiento de los picos cromatográficos de los COS obtenidos mediante P1 hacia mayores tiempos de retención, como consecuencia de la disminución del M_w causado por la actividad de la quitosanasa EC.1.2.3.132 sobre QsB. En la Figura IV.10B se observó por un lado, el desplazamiento del pico cromatográfico correspondiente al LMWC (QsB-Q) obtenido tras la hidrólisis ácida de P2, así como los desplazamientos de los picos correspondientes a los COS obtenidos tras la hidrólisis enzimática de QsB-Q, demostrándose que la doble hidrólisis también se llevó a cabo de manera efectiva. En la Figura IV.10C se observó un ligero desplazamiento del tiempo de retención en el pico correspondiente al quitosano reacetilado QsB-R, y por otro lado se vio de nuevo el desplazamiento de los picos cromatográficos de los COS hacia tiempos de elución mayores, demostrándose así que en el P3 también se llevó a cabo la depolimerización enzimática de una manera efectiva, pudiendo la quitosanasa hidrolizar también quitosanos con mayor DA, como ya se había comentado anteriormente.

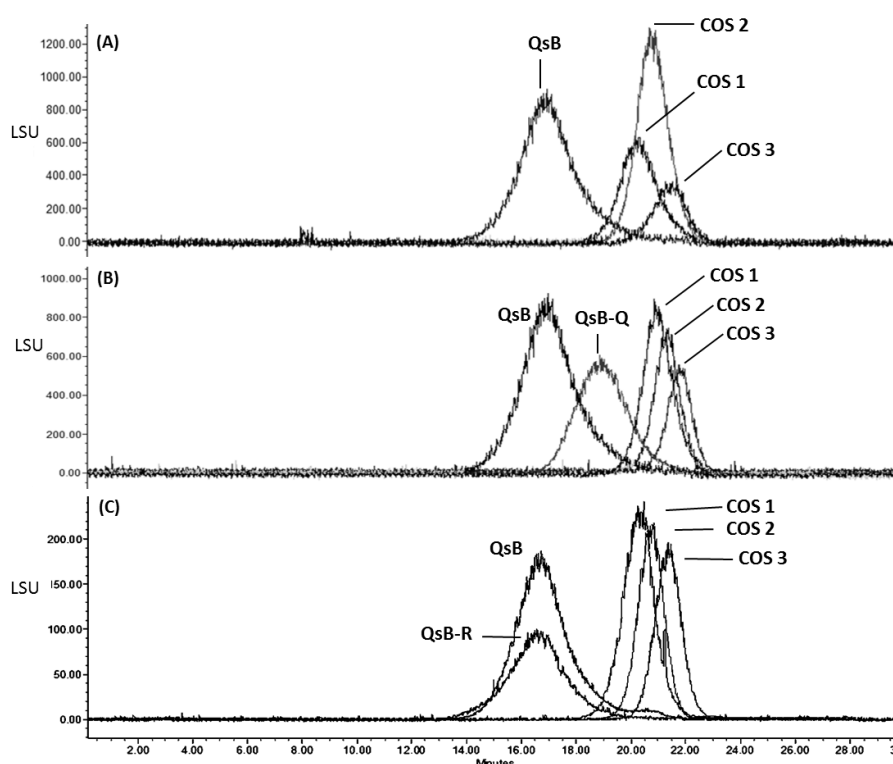


Figura IV.10. Perfiles cromatográficos de los tres procesos llevados a cabo a partir de QsB. (A) P1; (B) P2; (C) P3. Los procesos realizados a partir de QsA se muestran en el Anexo I.

Mediante extrapolación en una curva de calibrado de quitosanos, se determinó el \overline{M}_w de los COS 1 y COS 2 obtenidos mediante los tres procesos a partir de QsA y QsB (Tabla IV.4). La determinación del \overline{M}_w de los COS 3 no se especifica, debido a que su M_w se encontraba fuera

del límite de valores de \overline{M}_w empleados en la curva. No obstante, si se pudo observar el pico cromatográfico correspondiente a estas fracciones de COS 3 (Fig. IV.10).

Tabla IV.4. Peso molecular promedio (\overline{M}_w) e índice de polidispersidad (PDI) de los productos de hidrólisis obtenidos mediante P1, P2 y P3. COS 1 (M_w 30-10 kDa); COS 2 (M_w 10-5 kDa).

\overline{M}_w (kDa) PDI				\overline{M}_w (kDa) PDI			
QsA		89,49	1,50	QsB		114,47	1,46
QsA-Q		31,96	1,27	QsB-Q		22,17	1,33
QsA-R		95,75	1,14	QsB-R		98,69	1,09
P1	COS 1	18,28	1,38	P1	COS 1	17,21	1,04
	COS 2	8,64	1,24		P2	COS 1	8,16
P2	COS 1	12,58	1,13	P2		COS 2	2,75
	COS 2	5,02	1,20		P3	COS 1	8,24
P3	COS 1	18,86	1,09	P3		COS 2	7,43
	COS 2	8,63	1,07				

El PDI es una medida que refleja la heterogeneidad de la distribución del \overline{M}_w de un polímero. Las distribuciones de \overline{M}_w obtenidas reflejaron la polidispersidad de las muestras, característica fundamental que define a polímeros como el quitosano. En general, a medida que se separaron las fracciones de COS y se acotó el M_w de estas, se observó una disminución del PDI, la cual fue más acusada en los COS de QsB respecto a los de QsA. Este hecho reflejó la disminución de la heterogeneidad de los COS como consecuencia de haberlos separado mediante UF con membranas de distinto tamaño molecular (30, 10 y 5 kDa), demostrando que todos los COS obtenidos fueron menos polidispersos que los polímeros iniciales. Por ello, durante los procesos de obtención y separación de COS se favoreció la disminución de la polidispersidad del polímero como consecuencia del menor M_w , estando dentro del límite descrito por Ottøy *et al.*, (1996b), quienes establecieron que un PDI entre 1,5 y 2,0 para este tipo de polímeros no se considera polidisperso.

Inicialmente, la reproducibilidad de los procesos también estará influenciada por la polidispersidad de este sustrato polimérico, pero como pudo observarse tanto para el QsA como para el QsB, los COS obtenidos presentaron una polidispersidad normal. Es necesario tener presente que obtener mezclas de COS de estas características es más eficiente, en términos de coste económico y rendimiento del proceso, que la producción de COS con un rango de M_w muy estrecho.

Como se puede observar, algunos valores de \overline{M}_w obtenidos no se ajustaron al intervalo de tamaño de corte de M_w de las membranas de UF (Tabla IV.4). Se debe tener en cuenta que este resultado es un valor promedio de todos los tamaños de molécula presentes en la mezcla. Aunque algunos autores aluden a la complicación de establecer un intervalo unificado de \overline{M}_w en los COS mediante el uso de membranas de UF (Chen *et al.*, 2010), que además se encuentran descritas para proteínas, estos sistemas son los más eficientes y productivos que se conocen hasta el momento en sistemas de separación de COS (Zou *et al.*, 2016).

Proceso 1

Los valores de \overline{M}_w obtenidos para los COS de este proceso se encuentran dentro del límite del tamaño de poro de corte del peso molecular de las membranas empleadas para su separación (Tabla IV.4). Puesto que tanto QsA como QsB presentaron un DA $\sim 17\%$ y un PA aleatorio, el hecho de que QsB fuera de mayor \overline{M}_w podría favorecer que la enzima encontrara secuencias de hidrólisis con mayor probabilidad, generando COS de menor \overline{M}_w , contrario a lo que pudiera parecer debido a su mayor $[\eta]$ (443 ml/g y 394 ml/g respectivamente para QsB y QsA). Zang *et al.*, (2001) describieron una mayor susceptibilidad de degradación enzimática para quitosanos menos viscosos. Nuestros resultados demostraron que quitosanos parcialmente acetilados con un \overline{M}_w en un rango de 89,49 y 114,47 kDa pueden ser eficazmente hidrolizados por esta quitosanasa, a diferencia de lo que se plantea en algunos estudios, en los cuales se describe una mayor efectividad de hidrólisis a menor M_w (Li *et al.*, 2007). Por tanto, se podría considerar que ambos polímeros presentaron una $[\eta]$ adecuada, y no muy diferente entre ellos, para una hidrólisis efectiva según los datos encontrados en la bibliografía (Li *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2001).

Por otro lado, se debe tener en cuenta que la actividad hidrolítica de la quitosanasa también dependerá del DA y PA del sustrato, en función de los cuales habrá más o menos posibilidades de encontrar secuencias de hidrólisis (Vårum *et al.*, 1996). De ellos dependerá la densidad de carga total, el volumen hidrodinámico de las cadenas (Weinhold *et al.* 2009b), y las interacciones electroestáticas intra- e intermoleculares que se produzcan (Thadathil, *et al.*, 2014). En el caso de quitosanos con DA inferior a 20 %, el polímero exhibe la mayor densidad de carga estructural comportándose como un polielectrolito, en el cual, las interacciones electroestáticas intra e intermoleculares son las responsables de la expansión de las cadenas y de presentar mayor solubilidad (Sorlier *et al.*, 2001; Sorlier *et al.*, 2002; Schatz *et al.*, 2003b).

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, se podría considerar que el QsB presentó una conformación espacial que favoreció en cierta medida una mayor accesibilidad de la enzima a las secuencias de hidrólisis, generando COS de menor M_w que en el caso de QsA.

Proceso 2

Los resultados de \overline{M}_w obtenidos para los COS de este proceso se encuentran dentro del límite del tamaño de las membranas empleadas para su separación, a excepción del COS 2 P2 procedente de QsB, para el que se obtuvo un valor de 2,75 kDa (Tabla IV.4). El primer paso de este P2, una hidrólisis ácida, produjo un descenso significativo del \overline{M}_w de los sustratos iniciales, obteniéndose en ambos casos dos polímeros intermedios de 31,96 kDa y 22,17 kDa respectivamente para QsA-Q y QsB-Q. En la segunda etapa, la hidrólisis enzimática realizada sobre QsA-Q y QsB-Q generó COS de menor \overline{M}_w respecto a los COS de P1, obtenidos a partir de QsA y QsB, indicando de nuevo la adaptabilidad de esta quitosanasa para hidrolizar quitosanos parcialmente acetilados y con diferentes \overline{M}_w . Con todo ello, en este estudio se comprobó que LMWC (\overline{M}_w entre 22,17 y 31,96 kDa) son más susceptibles de ser hidrolizados enzimáticamente generando COS de menor \overline{M}_w .

Esta hidrólisis ácida ocurre en condiciones homogéneas y se produce aleatoriamente (Vårum *et al.*, 1991a). La tasa de despolimerización de esta reacción es independiente del \overline{M}_w del quitosano inicial, como ha podido comprobarse, y el ácido se consume en relación estequiométrica a la cantidad de N-glucosamina (Allan *et al.*, 1995a). De nuevo, la $[\eta]$ de QsB, así como la disposición espacial que adoptasen sus cadenas por presentar un PA aleatorio distinto a QsA, podría estar favoreciendo que este se degrade químicamente con mayor susceptibilidad que QsA, generando un LMWC de menor \overline{M}_w (22,17 kDa respecto a 31,96 kDa).

Como se ha comentado anteriormente, varios autores propusieron que los LMWC son más susceptibles a la degradación enzimática (Li *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2001). En este proceso se comprobó por tanto, que el hecho de haber reducido significativamente el \overline{M}_w de QsA y QsB con una hidrólisis ácida, sí favoreció la obtención de COS de menor \overline{M}_w . Aun así, como se ha comentado, el DA y el PA continúan siendo parámetros fundamentales para que la quitosanasa actúe de manera eficaz, los cuales determinarían la posibilidad de que la enzima encuentre las secuencias de hidrólisis (D-D o D-A), y su accesibilidad a ellas (Vårum *et al.*, 1996).

Proceso 3

Los valores de \overline{M}_w obtenidos para los COS de este proceso se encuentran dentro del límite del tamaño de corte de las membranas empleadas para su separación, a excepción del COS 1 P3 procedente de QsB, para el que se obtuvo un valor de 8,24 kDa (Tabla IV.4). El \overline{M}_w de los quitosanos reacetilados QsA-R y QsB-R no varió de manera significativa respecto a los valores de QsA y QsB, aun habiéndose sustituido grupos amino del C-2 por grupos N-acetilo en el proceso de la reacetilación. Tal y como se viene observando en otros procesos, los COS procedentes de QsB mostraron unos \overline{M}_w inferiores respecto a los procedentes de QsA. La hidrólisis enzimática sobre QsA-R y QsB-R generó COS de menor \overline{M}_w que el polímero sustrato, por lo que se demostró una actuación efectiva de la quitosanasa sobre quitosanos con DA superiores (DA ~ 43 %) a los propuestos hasta ahora en la bibliografía (Fukamizo *et al.*, 1995; Cabrera *et al.*, 2005; Mengíbar *et al.*, 2011; Mengíbar *et al.*, 2013).

En este proceso, el DA y el PA de los sustratos QsA-R y QsB-R favorecerían igualmente que las cadenas se dispusieran con una conformación espacial facilitando la accesibilidad a la secuencias de hidrólisis y la actuación de la quitosanasa. Varios autores han demostrado que quitosanos con DA ~35 % son más susceptibles de ser degradados enzimáticamente que otros menos acetilados (Li *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2001). En este estudio se comprobó que la hidrólisis enzimática fue efectiva en polímeros con DA ~ 43 %. En este rango de DA (entre 20 y 50 %), las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas se contrarrestan progresivamente, haciendo que parámetros fisicoquímicos como la viscosidad intrínseca o el radio de giro de la molécula permanezcan más o menos constantes (Schatz *et al.*, 2003a). En polímeros con DA superiores a 50 % se favorecen las interacciones hidrofóbicas entre los grupos acetilos, los cuales predominan, dando lugar a la formación de agregados. Este hecho sumado a la disminución de enlaces del tipo D-D y D-A disponibles probablemente disminuiría la actuación enzimática, al contrario de lo que parece que sucede cuando el DA es alrededor de 40 %.

2.4. Análisis de la distribución de grados de polimerización y de la composición intramolecular.

Con objeto de conocer detalladamente la composición intramolecular (proporción de A respecto de D) y grados de polimerización (DP) de las moléculas que componen las fracciones, se llevó a cabo un análisis de espectrometría de masas MALDI-TOF. Esta metodología, ampliamente utilizada para analizar carbohidratos (Yang *et al.*, 2010), permite detectar eficazmente hasta oligómeros de DP 17 (Zhang *et al.*, 1999) y DP 18 (Wu *et al.*, 2008), y ofrece la posibilidad de estudiar la composición intramolecular de los oligómeros de quitosano. Otros autores han llegado a detectar en COS oligómeros con DP mayores de 24 mediante sistema MALDI-TOF (Mengíbar *et al.*, 2011).

En esta sección, el análisis se ha centrado en el estudio de la composición intramolecular de las fracciones de COS 3 ($M_w < 5$ kDa), ya que además de presentar un intervalo de distribución de DP adecuado para este tipo de análisis, previamente no se pudo determinar su distribución de pesos moleculares promedio mediante cromatografía HP-SEC.

2.4.1. Análisis de la composición intramolecular y la distribución de grados de polimerización de COS 3

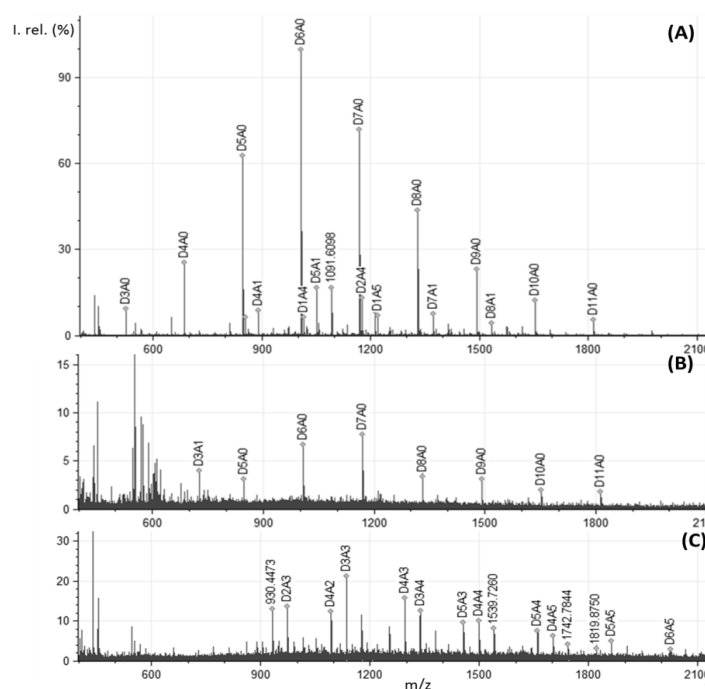


Figura IV.11. Espectros de masas de los COS 3 ($M_w < 5$ kDa) obtenidos mediante los tres procesos a partir de QsA. (A) COS 3 P1; (B) COS 3 P2; (C) COS 3 P3. Los espectros de masas correspondientes a los COS 3 obtenidos a partir de QsB se muestran en el Anexo I.

Las fracciones de COS 3 ($M_w < 5$ kDa) obtenidas mediante los tres procesos a partir de QsA y QsB se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. En general, los resultados mostraron mezclas de COS heterogéneas tanto en abundancia de DP como en abundancia y composición de moléculas acetiladas (Fig. IV.11). La asignación se hizo en función de su relación m/z respecto a las masas calculadas teóricamente (véase Anexo II).

Distribución de grados de polimerización

La Figura IV.12 resume la abundancia y distribución de DP que componen los COS 3 obtenidos a partir de QsA y QsB. Los COS 3 obtenidos a partir de QsA mostraron una distribución de DP entre 3 y 11, siendo los DP entre 5 y 7 los más abundantes en los tres procesos, y variando la frecuencia del resto de DP en cada proceso (Fig. IV.12A). No se observaron diferencias significativas en relación al DP promedio mayoritario obtenido en cualquiera de los procesos a partir de QsA. Ciñéndonos a la frecuencia de aparición de los DP4, se observó mayor abundancia en el P2, pudiendo contribuir esta proporción de DP a un menor \overline{M}_w en COS 3, como se observó en las fracciones de COS 2 y COS 1 que procedían de este quitosano mediante este proceso.

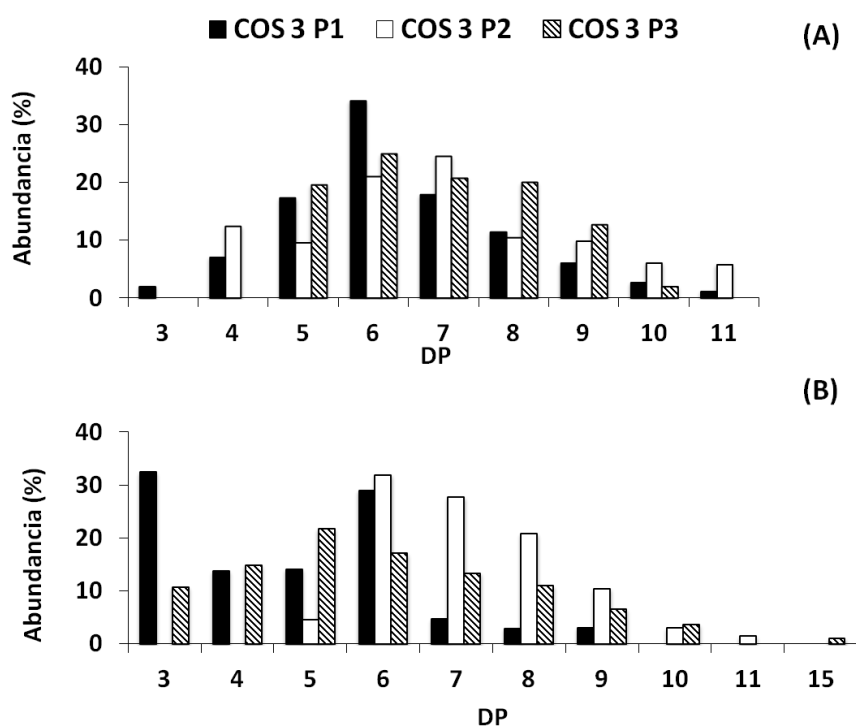


Figura IV.12. Distribución y abundancia total (%) de DP detectados en los COS 3 obtenidos mediante los tres procesos. A partir de (A) QsA y (B) de QsB.

Por otra parte, los COS 3 obtenidos a partir de QsB mostraron una distribución de DP entre 3 y 15, variando su abundancia según el proceso (Fig. IV.12B). En general, se observó mayor heterogeneidad en la distribución de DP entre los procesos llevados a cabo a partir de QsB. En este caso cabe destacar la abundancia de DP3 obtenida en P1 y la mayor frecuencia de DP3 y DP4 en P1 y P3 en este quitosano respecto al QsA.

Análisis de la composición intramolecular

Tabla IV.5. Abundancia total (%) de moléculas con distinto número de acetilaciones detectadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. **A0** hace referencia a oligómeros completamente desacetilados. (*) DA determinado mediante ^1H -RMN.

QsA	DA (%)*	Nº N-acetilglucosaminas							
		A0	A1	A2	A3	A4	A5	A6	
COS 3 P1	12	77	10	4	0	6	2	0	
COS 3 P2	13	88	12	0	0	0	0	0	
COS 3 P3	42	0	0	19	44	24	10	3	

QsB	DA (%)*	A0	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A10
COS 3 P1	10	43	7	23	5	11	0	0	0	0	0
COS 3 P2	10	78	7	7	3	3	1	0	0	0	0
COS 3 P3	31	30	7	0	7	13	16	13	8	4	1

Proceso 1

En los COS 3 obtenidos mediante P1 a partir de QsA y QsB (Fig. IV.11A, anexo I), se obtuvo un espectro de masas con un perfil típico correspondiente a los productos de hidrólisis de despolimerización enzimática con quitosanasa EC.1.2.3.132. Este patrón típico está formado por una serie de oligómeros completamente desacetilados (nombrados como A0), los cuales predominan, y por oligómeros acetilados, los cuales presentan la siguiente composición molecular: $D_{n-m}A_m$, donde m se refiere al número de unidades A, y n se refiere al número de unidades D, tomando valores entre los valores mínimos y máximos de DP (Mengibar *et al.*, 2011; Cabrera *et al.*, 2005; Ohtakara *et al.*, 1998). En dichos COS 3 se detectaron secuencias con hasta 5 acetilaciones, siendo estas de escasa (2% de A5 en COS 3 P1 QsA) o nula (0% de A5 en COS 3 P1 QsB) abundancia en este proceso (Tabla IV.5). Estos resultados demostraron la tendencia de la quitosanasa a generar oligómeros A0 mediante P1 a partir de QsA y QsB, siendo más notable la presencia de dichos oligómeros en QsA que en QsB (77 % respecto a 43

% de oligómeros A0). Cabe destacar la abundancia de oligómeros di-acetilados (A2 = 23 %) y tetra-acetilados (A4 = 11 %) en el COS 3 P1 procedente de QsB respecto a la composición de su homólogo obtenido a partir de QsA (Tabla IV.5).

Proceso 2

Los espectros de masas de los COS 3 procedentes de P2 a partir de QsA y QsB (Fig. IV.11B, anexo I), también mostraron un perfil típico esperado para los productos de hidrólisis de quitosanasa EC.1.2.3132, ya que se observó el predominio de oligómeros A0 así como mono-acetilados (Tabla IV.5). En COS 3 P2 procedente de QsA destacó la ausencia de oligómeros con más de una acetilación (Fig. IV.11B), hecho que sí se observó en el caso de COS 3 P2 procedente de QsB, en el cual se detectó una mezcla de moléculas con hasta 5 acetilaciones, siendo las mono- y di-acetiladas las más abundantes (Tabla IV.5). Estos resultados, de nuevo demostraron la tendencia de la quitosanasa a generar oligómeros A0, los cuales predominan respecto a las acetilados.

Como se había comentado anteriormente, el P2 favoreció la generación de COS con mayor abundancia de extremos reductores ocupados por unidades D, como consecuencia directa de la doble hidrólisis. Tras analizar la composición intramolecular mediante MALDI-TOF-MS, se comprobó que la presencia de oligómeros A0 fue más abundante en los COS 3 procedentes de P2, respecto a los COS 3 de P1. Comparando la abundancia de oligómeros A0 de COS 3 P1 y COS 3 P2, se observó una mayor diferencia en el caso de QsB que en el de QsA. Mediante este análisis se comprobó que el hecho de obtener COS a partir de P1 o P2 sí afecta a la composición de los COS, y por tanto al DA promedio de la fracción, hecho que no se observaba tan claramente mediante ^1H -RMN. Por tanto, mediante MALDI-TOF-MS se comprobó que los COS procedentes de P2 presentaron mayor desacetilación (proporción de oligómeros A0) respecto a los COS procedentes de P1, y eso fue como consecuencia de la doble hidrólisis.

Al igual que sucedía en P1, en los COS 3 P2 procedente de QsB se observó una mayor abundancia de oligómeros más acetilados respecto a QsA, en el que solo se detectaron moléculas mono-acetiladas (12 %). Cabe destacar que estas acetilaciones únicamente se encontraron en oligómeros de DP5. Si se relaciona este resultado con los menores \overline{M}_w del resto de los COS procedentes de QsB respecto de los COS procedentes de QsA, se vuelve a comprobar que QsB debió presentar una conformación espacial diferente a la de QsA. Dicha disposición, como consecuencia de un PA en el que el orden de A y D sea distinto al que

podiera encontrarse en QsA, daría lugar a una serie de interacciones intra- e intermoleculares tales que la quitosanasa dispondría de mayor accesibilidad para actuar sobre las secuencias de hidrólisis (D-D y D-A).

Proceso 3

Para los COS 3 procedentes de P3 a partir de QsA y QsB (Fig. IV.11C, anexo I) se obtuvo un espectro de masas con un perfil diferente debido a que al proceder de un quitosano reacetilado, con DA superior respecto a P1 y P2, se generó mayor heterogeneidad de oligómeros acetilados (Tabla IV.5). Cabe destacar la ausencia de oligómeros A0 y mono-acetilados en el COS 3 P3 procedente de QsA, respecto al 30 % de A0 y 7% de A1 hallado en COS 3 P3 procedente de QsB. Aunque se partió de sendos quitosanos con un DA similar (~ 43 %), como ya se ha sugerido anteriormente, la probabilidad de que las cadenas del QsB-R adoptasen una conformación espacial distinta a las del QsA-R, podría provocar que la enzima tuviera más accesibilidad a las secuencias de hidrólisis D-D, generando un 30 % de oligómeros completamente desacetilados.

Conclusiones parciales

En este capítulo se demostró que tanto el quitosano de origen como el proceso de obtención de COS en particular afectarán en las características fisicoquímicas de estos. Se pudo deducir que dentro de los parámetros fisicoquímicos que definen al quitosano, el PA y la posición concreta de las unidades A y D a lo largo de las cadenas, van a determinar la intensidad de las interacciones electroestáticas intra- e intermoleculares que se produzcan cuando el polímero se encuentra en solución, y ello afectará a su conformación espacial. La naturaleza de estas interacciones definirá el comportamiento en solución del polisacárido y determinarán cómo se producirá el proceso de despolimerización, ya sea químico o enzimático. Por ello, la preparación de COS a partir de quitosanos con un DA, PA y \overline{M}_w similares, como el QsA y QsB, dio lugar a COS con diferentes características fisicoquímicas.

- La quitosanasa EC.1.2.3.132 procedente de *Streptomyces griseus* hidrolizó de manera efectiva quitosanos parcialmente acetilados que presentaron un DA entre 17 % y 43 % y un peso molecular promedio en peso entre 22,17 kDa y 114,47 kDa.
- En el P1 se obtuvieron mezclas heterogéneas de oligómeros con PA dominante aleatorio, en las que aumentaron los extremos reductores ocupados por unidades D

respecto a los quitosanos QsA y QsB. Las fracciones de COS de <5 kDa presentaron predominancia de oligómeros A0, así como mono- y di-acetilados, en ambos quitosanos.

- En el P2 también se obtuvieron mezclas heterogéneas de oligómeros con PA dominante aleatorio. Estos COS presentaron menor \overline{M}_w y mayor abundancia de extremos reductores ocupados por unidades D que los obtenidos mediante P1. Los COS <5 kDa presentaron mayor porcentaje de oligómeros A0 con respecto a los obtenidos en P1, y presentaron moléculas con hasta 5 acetilaciones en el caso de QsB. En este proceso cambió la composición de las fracciones de COS apareciendo HMF y AGEs.
- En el P3 se obtuvieron mezclas heterogéneas de oligómeros con PA perfecto aleatorio y con mayor presencia de extremos reductores ocupados por unidades A respecto a P1 y P2. Los COS < 5 kDa presentaron secuencias con mayor número de acetilaciones respecto a P1 y P2 (hasta 10 acetilaciones). Es destacable la obtención de COS 3 con ausencia de oligómeros A0 a partir de QsA.
- Quitosanos con características fisicoquímicas similares (DA, PA y \overline{M}_w) pueden presentar diferentes conformaciones espaciales en solución, influyendo en la actuación enzimática y dando lugar a mezclas de COS diferentes entre sí en cuanto a longitud de las cadenas y composición de estas. En todos los procesos procedentes de QsB se obtuvieron COS de menor \overline{M}_w y con mayor abundancia de DP menores que a partir de QsA.

3. ESTUDIO DE PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LOS QUITOOLIGOSACÁRIDOS

El estudio de las propiedades biológicas de los COS es un área de investigación que ha ido aumentando en los últimos años, ya que estos oligosacáridos, además de proceder de un polímero natural, como es el quitosano, ofrecen múltiples posibilidades de aplicación debido a su alta biodegradabilidad y biocompatibilidad (Zou *et al.*, 2016; Ngo *et al.*, 2015). La baja viscosidad que presentan los COS en solución y su alta solubilidad a pH fisiológico, hace que estos puedan emplearse de forma eficiente como agentes antimicrobianos frente a un amplio espectro de microorganismos (Park *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2001), como agentes antioxidantes naturales (Li *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2001), o agentes antiinflamatorios (Azuma *et al.*, 2015; Chung *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2010) entre otros. Recientemente, se ha descrito que los COS pueden mejorar la absorción de principios activos en el tracto intestinal, ya que pueden presentar una buena capacidad mucoadherente (Zhou *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2008). Los grupos funcionales más reactivos de las moléculas de COS son los grupos hidroxilos, localizados en las posiciones C-2, C-3 y C-6 del anillo de glucosamina, así como el grupo amino y el grupo N-acetilo situado en posición C-2, uno de los principales responsables de las propiedades fisicoquímicas que presentan (Kurita *et al.*, 1998).

Con el fin de definir las características fisicoquímicas necesarias y adecuadas para que una mezcla de COS pueda ser usada para desarrollar una actividad biológica, se ha pretendido avanzar en los procesos de obtención de mezclas de COS de distinta composición y ampliar el conocimiento acerca del comportamiento biológico de estos, lo que ha permitido también ampliar el conocimiento sobre las relaciones entre su estructura fisicoquímica y su función biológica.

Para ello, se ha estudiado la actividad antimicrobiana, la cual está estrechamente influenciada por la naturaleza del microorganismo, empleando como modelo dos cepas de diferente patogenicidad. Por otro lado, se ha estudiado cómo se ve afectada la actividad antioxidante de los COS en función del proceso de obtención, empleando distintos métodos de evaluación de esta actividad, los cuales han permitido establecer hipótesis acerca del posible mecanismo de acción antioxidante. También se ha comprobado si se mantiene la capacidad de mucoadhesión en los COS. En último lugar, se ha evaluado la capacidad antiinflamatoria de los COS tanto *in vitro* como *in vivo*, lo cual ha permitido valorar la importancia de tener productos altamente

definidos fisicoquímicamente, así como establecer una relación entre procesos de obtención de COS y actividad anti- o proinflamatoria.

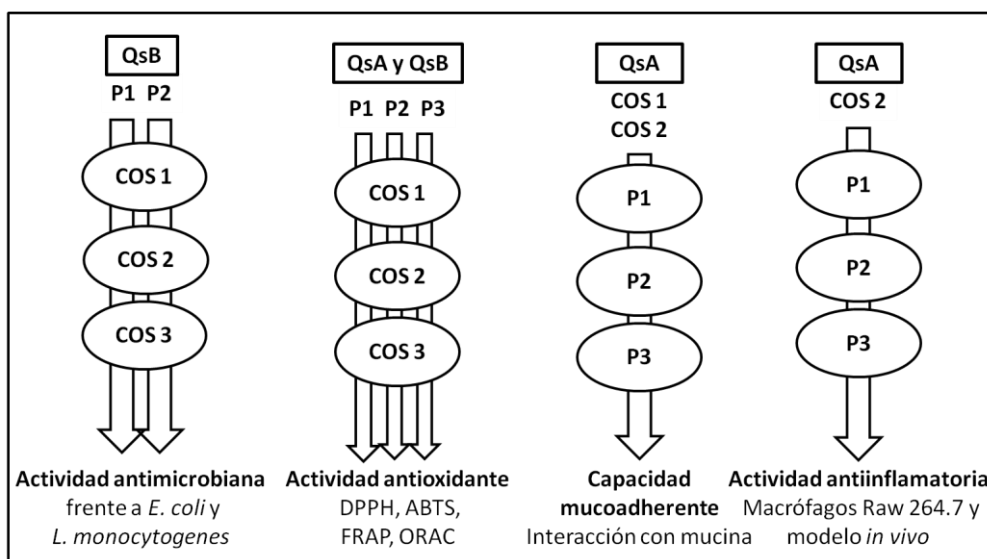


Figura IV.13. Esquema resumen de las propiedades biológicas estudiadas.

La determinación de todas estas propiedades biológicas se llevó a cabo con todas las fracciones de COS, como el caso de la actividad antioxidante, o con los COS obtenidos a partir de procesos concretos, como la actividad antimicrobiana, la cual se estudió con los COS obtenidos mediante P1 y P2 procedentes de QsB. La capacidad mucoadherente se comprobó en COS procedentes de QsA, y por otro lado, la actividad antiinflamatoria se estudió con los COS 2 obtenidos a partir de QsA mediante P1, P2 y P3.

3.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS COS

Existen numerosos estudios que reconocen a los COS como potenciales agentes antimicrobianos y que atribuyen su acción tanto a la procedencia del quitosano y sus características, como a las especies de microorganismos frente a las cuales se evalúa dicha actividad (Park *et al.*, 2015; Gerasimenko *et al.*, 2004; No *et al.*, 2002; Jeon *et al.*, 2001). En anteriores trabajos de nuestro grupo de investigación, se comprobó que los COS con M_w intermedio y un DA bajo (DA = 9 %) presentaban mejor comportamiento antibacteriano frente a un microorganismo gram negativo respecto a otras fracciones con DA de 25% (Mengíbar *et al.*, 2011). Este comportamiento se atribuye al carácter catiónico que le otorgan los grupos amino libres del polisacárido, los cuales pueden formar interacciones electrostáticas con biomoléculas cargadas negativamente presentes en la superficie celular bacteriana, tales como lípidos, carbohidratos o proteínas (Benhabiles *et al.*, 2012; Takahashi *et al.*, 2008). Por esta

razón, se seleccionaron los COS procedentes de P1 y P2, ya que presentaron unos DA bajos respecto a los COS procedentes de P3. Por otro lado, y basándonos en los resultados de la composición intramolecular, se seleccionaron los COS procedentes del QsB, en los cuales se encontró una mayor variabilidad en la abundancia de oligómeros A0, a pesar de haber presentado un DA promedio similar. Con estas fracciones, se estudió el efecto antibacteriano frente a dos cepas de microorganismos, *Escherichia coli* como gram negativa y *Listeria monocytogenes* como gram positiva, pudiendo llegar a establecer relaciones entre la composición de los COS y la naturaleza de los microorganismos.

3.1.1. Actividad antimicrobiana de los COS procedentes de QsB frente a *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*.

En la Tabla IV.6 se muestran los porcentajes de inhibición del crecimiento bacteriano respecto al control, así como la concentración mínima inhibitoria (MIC) determinada para las dos cepas de microorganismos estudiadas. Se observó que *E. coli* fue el microorganismo más susceptible a la presencia de COS en el medio de cultivo. Se comprobó la influencia del M_w sobre la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano, ya que fracciones de COS 1 y COS 2 con un \overline{M}_w entre 5,64 y 17,21 kDa mostraron mayor capacidad inhibitoria que otras con un \overline{M}_w inferior (COS 3). Asimismo, el COS 1 P1 mostró el efecto más potente, y se determinó su MIC a 5 mg/ml para *E. coli* y a 10 mg/ml para *Listeria monocytogenes*.

Tabla IV.6. Porcentaje de inhibición (%) del crecimiento bacteriano (IIRC) respecto al control (sin tratamiento) de los COS procedentes de QsB mediante P1 y P2. Los resultados representan la media \pm error típico.

QsB	Conc. (mg/ml)	<i>E. coli</i>		<i>Listeria monocytogenes</i>	
		P1	P2	P1	P2
COS 1	10	100 \pm 4	86 \pm 5	100 \pm 1	34 \pm 13
	5	100 \pm 4	66 \pm 3	37 \pm 12	0
	2	70 \pm 5	60 \pm 2	7 \pm 5	0
	1	58 \pm 5	51 \pm 4	11 \pm 5	0
COS 2	10	100 \pm 2	55 \pm 1	72 \pm 8	34 \pm 23
	5	100 \pm 1	54 \pm 5	30 \pm 13	0
	2	64 \pm 4	50 \pm 3	0	0
	1	53 \pm 4	32 \pm 5	0	0
COS 3	10	49 \pm 3	40 \pm 2	11 \pm 5	0
	5	48 \pm 5	30 \pm 3	11 \pm 3	0
	2	29 \pm 4	16 \pm 4	0	0
	1	15 \pm 4	0	0	0

Por otro lado, El COS 2 P1 inhibió completamente a *E. coli* siendo su MIC de 5 mg/ml, y en el caso de *Listeria monocytogenes*, dicho COS produjo un 72 % de inhibición del crecimiento respecto al control a 10 mg/ml. En cambio, ninguno de los COS procedentes de P2 lograron inhibir completamente ninguno de los microorganismos estudiados, alcanzándose como máximo un 86 % de inhibición del crecimiento de *E. coli* con el COS 1 P2 a 10 mg/ml en el mejor de los casos.

En general, los valores de MIC encontrados en este estudio fueron inferiores a los encontrados por Du *et al.*, (2009) para fracciones hidrosolubles de COS obtenidas por hidrólisis química, las cuales también mostraron una fuerte capacidad para inhibir otra cepa de *E. coli*. Por otro lado, los resultados obtenidos son similares a los expuestos por Jeon *et al.*, (2001), quienes obtuvieron COS mediante hidrólisis enzimática separados mediante ultrafiltración. Estos autores observaron mejor comportamiento antibacteriano frente a *E. coli* para COS con un M_w entre 7 y 24 kDa, DA~11%, y demostraron que el efecto inhibitor disminuyó para COS con M_w inferiores a 10 kDa. Posteriormente otros autores han demostrado que este efecto también es dependiente de la dosis ensayada (Li *et al.*, 2010).

Otra consideración a tener en cuenta, es que numerosos trabajos han demostrado que las propiedades antimicrobianas de los COS dependen estrechamente de la naturaleza de la cepa microbiana en cuestión (Younes *et al.*, 2014; Chung, 2008; Gerasimenko *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2002). Como se apuntaba en la introducción, las bacterias *gram negativas* presentan mayor densidad de cargas negativas en la superficie externa celular debido a la presencia del LPS, respecto a las *gram positivas*, que presentan una gruesa capa de peptidoglicano unida a la membrana plasmática por ácidos lipoteicoicos, los cuales constituyen un polianión. Este hecho podría explicar por qué *E. coli* fue la cepa más sensible a la presencia de COS en el medio de cultivo (Li *et al.*, 2010). En este contexto Fernandes *et al.*, (2008), describieron que COS de menor M_w (< 5 kDa) eran más activos contra bacterias *gram negativas*, y COS con moléculas de mayor M_w contra bacterias *gram positivas*.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron la mayor susceptibilidad de *E. coli* a la presencia de COS con M_w superior a 5 kDa y un DA entre 10 y 14 %. Sin embargo, *Listeria monocytogenes* únicamente fue totalmente inhibida por la presencia de COS 1 P1 (M_w 17kDa, DA 14%). Esto, sumado a la capacidad que presenta *L. monocytogenes* para metabolizar quitina, quitosano o cualquiera de sus productos de degradación, debido a la presencia de un complejo de glicosil hidrolasas capaz de activarse en presencia de COS (Leisner *et al.*, 2008; Larsen *et al.*, 2010), podría estar haciendo más resistente a esta cepa a la presencia de COS en

el medio de cultivo. Aun así se demostró la efectividad de la fracción COS 1 P1 para inhibir completamente el crecimiento de *Listeria monocytogenes* a 10 mg/ml.

El mecanismo mediante el cual este tipo de polisacáridos producen efecto antibacteriano no está del todo claro, existiendo actualmente tres supuestos principales que lo intentan explicar. Uno de ellos propone que la acción antibacteriana sucede debido a la carga positiva que adquieren los grupos amino libre del quitosano en disolución (NH^{3+}), permitiendo que el polisacárido pueda interactuar con la superficie celular bacteriana a través de interacciones electroestáticas, formándose así agregados sobre la superficie celular que impedirían cualquier transporte de nutrientes hacia el interior de la célula, produciéndose la muerte de la bacteria (Sudarshan *et al.*, 1992; Helander *et al.*, 2001). El segundo supuesto, al igual que el primero, también establece la participación de los COS de manera extracelular, y propone la formación de una barrera externa como consecuencia de la interacción entre los nutrientes esenciales y las moléculas de COS. Esta interacción sería debida a la capacidad quelante descrita para las moléculas de quitosano y conllevaría el secuestro de nutrientes esenciales para el crecimiento celular, lo cual conduciría a la muerte de la bacteria (Cuero *et al.*, 1999). Por otra parte, la explicación alternativa propone un mecanismo antibacteriano basado en el supuesto de que los COS son capaces de atravesar la pared y membrana plasmática entrando al citoplasma celular, donde sus grupos amino interaccionarían con los grupos fosfato del ADN, impidiéndose el proceso de transcripción celular y finalmente provocando la muerte celular. Este último supuesto requiere la penetración de las moléculas de COS al medio intracelular bacteriano y para ello, se describe que los COS de menor M_w serían más activos que aquellos de mayor M_w (Kim *et al.*, 2003).

El potente efecto inhibidor observado por parte de fracciones con \overline{M}_w intermedio (M_w 5,64 – 17,21 kDa), frente a aquellos COS de menor M_w ($M_w < 5$ kDa) plantea en cuanto a mecanismos de actividad antimicrobiana, que los grupos catiónicos de las moléculas de mayor M_w pudieran ser los responsables de que se produzca una interacción polímero-superficie celular, inhibiéndose así el crecimiento bacteriano. Este planteamiento, no excluiría la posible penetración de moléculas de menor M_w en la célula, puesto que se trata de mezclas heterogéneas de COS con distinto DP.

Teniendo en cuenta que los COS 1 procedentes de P1 presentaron un efecto antibacteriano más potente que los COS 1 P2, se demostró no solo la influencia del tamaño, sino también de la composición de estas muestras en la actividad estudiada. A priori estos COS presentaron un DA similar (11 % y 10 % respectivamente), sin embargo se observaron diferencias en su

composición intramolecular, y a continuación se plantea cómo esta podría estar influyendo al comportamiento antimicrobiano.

3.1.2. Estudio de la composición intramolecular de los COS 1

Las fracciones de COS 1 P1 y COS 1 P2 se analizaron mediante MALDI-TOF-MS. Debido a que el elevado \overline{M}_w de estas fracciones dificulta su correcta ionización, imposibilitando la realización de un análisis de masas, estos COS se hidrolizaron previamente con una quitosanasa procedente de *Alternaria alternata* (en adelante CTS). Dicha enzima hidrolizó solo y exclusivamente enlaces O-glicosídicos que se encontraron en la secuencia DA-XX de manera endo-hidrolítica. De esta manera, los productos de hidrólisis obtenidos de estos COS 1 se analizaron correctamente mediante MALDI-TOF-MS.

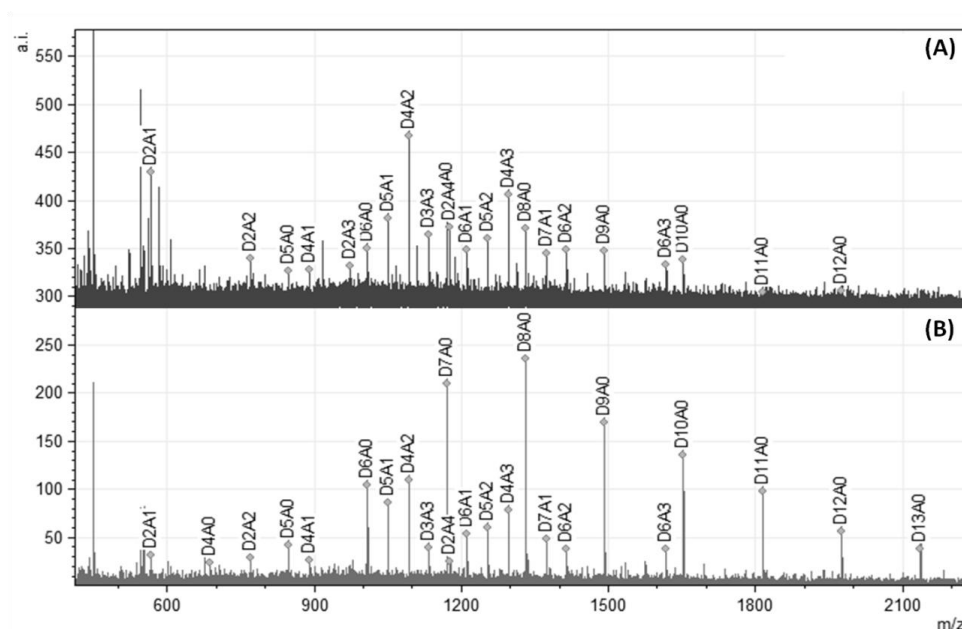


Figura IV.14. Espectros de masas de los productos de hidrólisis tras despolimerizar con CTS los COS 1 obtenidos a partir de QsB. (A) COS 1 P1. (B) COS 1 P2. Para la asignación de cada pico se expresa el número de unidades desacetiladas (D) seguido del número de unidades acetiladas (A) que componen cada DP en concreto.

El planteamiento experimental basado en hidrolizar un polímero y posteriormente analizar los productos de la despolimerización para conocer como era el sustrato, ya se utiliza actualmente para conocer el DA y el PA exactos de muestras homogéneas de COS (Hamer *et al.*, 2014), definidas estas como fracciones con un rango muy estrecho de DP (por ejemplo DP 5-6). Sin embargo, aún no se conoce su alcance en mezclas de COS heterogéneas como las que se han definido en este trabajo, en las cuales tanto la composición intramolecular como el rango de DP son más variables.

En la Figura IV.14 se muestran los espectros de masas de los productos de hidrólisis generados a partir de los COS 1 P1 y COS 1 P2 procedentes de QsB. La asignación de las señales se hizo en función del valor de su relación m/z con diferentes DP y composición, comparándolas con los valores calculados teóricamente (Anexo II). En ambos casos, la distribución de DP de los productos de hidrólisis osciló entre 3 y 12-13 (Fig. IV.15), y estos estaban compuestos por oligómeros completamente desacetilados, así como por moléculas con hasta 4 acetilaciones (Tabla IV.7).

Tabla IV.7. Abundancia total (%) de oligómeros con distinto número de acetilaciones detectadas en los productos de hidrólisis de COS 1 P1 y COS 1 P2 procedentes de QsB tras la hidrólisis con CTS. (1) Grado de acetilación determinado mediante ^1H -RMN. (2) Peso molecular promedio determinado mediante HP-SEC.

Nº de acetilaciones	A0	A1	A2	A3	A4	DA (%) ¹	\overline{M}_w (kDa) ²
COS 1 P1	27	25	24	18	5	14	17,21
COS 1 P2	63	14	13	9	1	10	8,16

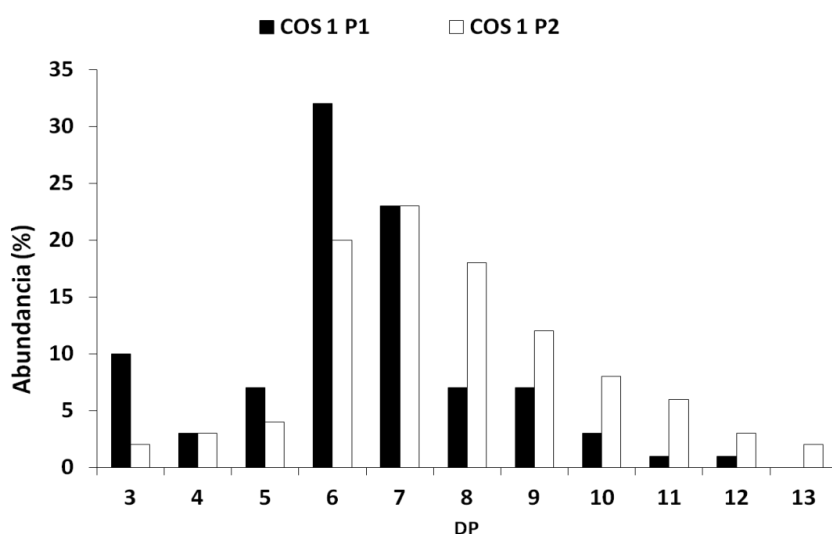


Figura IV.15. Distribución y abundancia total (%) de DP detectada en de los productos de hidrólisis de COS 1 P1 y COS 1 P2 procedentes de QsB. La abundancia se calculó en función a la intensidad relativa que presentaron las diferentes asignaciones.

En la distribución de DP del COS 1 P2 predominaron moléculas con DP entre 6 y 13, mientras que en el COS 1 P1 predominaron DP inferiores (DP 3, 6 y 7) (Fig.IV.15). Puesto que la enzima CTS hidrolizó de manera endo-hidrolítica exclusivamente los enlaces tras la secuencia DA-, y teniendo en cuenta los DA promedio de estas muestras (14 % y 10 % respectivamente para COS 1 P1 y COS 1 P2), se comprobó que en el COS 1 P2 dicha enzima tuvo menor probabilidad

de encontrar la secuencia de hidrólisis (DA-XX) y por tanto dio lugar a una mayor abundancia de secuencias con mayor DP.

Respecto a la composición intramolecular de estos productos de hidrólisis (Tabla IV.7), los oligómeros generados a partir de COS 1 P2 (Fig. IV.14B) presentaron mayor abundancia de oligómeros A0 (63 %) respecto a los productos de hidrólisis de COS 1 P1 (A0 = 27 %) (Fig. IV.14A), en los que además aparecieron con abundancia similar oligómeros mono-, di-, y tri-acetilados (25 %, 24 % y 18 % respectivamente). Estos resultados coinciden con el hecho de que la enzima CTS tuviera menor probabilidad de encontrar secuencias de hidrólisis (DA-XX) en COS 1 P2, dando lugar a mayor abundancia de oligómeros A0 y, como se acaba de comentar, de mayor DP. Puesto que mediante este análisis sólo se disminuyó el M_w de estos COS, se consideró por tanto que este perfil de composición intramolecular sería extrapolable a la composición original de las fracciones de COS 1. Respecto a la composición intramolecular, se comprobó la similitud entre estos resultados y los obtenidos para los COS 3 homólogos de los mismos procesos, coincidiendo en ambos casos una mayor abundancia de oligómeros A0 para las muestras procedente del P2, , respecto a las muestras procedentes del P1.

3.1.3. Relación entre la actividad antibacteriana de COS 1 y su composición intramolecular

Considerando que la composición intramolecular de los productos de hidrólisis de los COS 1 se puede extrapolar a la composición de los COS 1 originales, el COS 1 P1 formado por una mayor presencia de oligómeros acetilados (25 % A1; 24% A2 y 18 % A3) mostró mayor capacidad para inhibir el crecimiento de los dos microorganismos estudiados que el COS 1 P2, formado por un 63 % de oligómeros A0. Aunque para este tipo de polímeros está descrita la necesidad de un bajo DA (DA 8 – 15 %) para conseguir un potente efecto antibacteriano (Takahashi *et al.*, 2008; Gerasimenko *et al.*, 2004; Chung *et al.*, 2004; Tsai *et al.*, 2002), algunos autores han encontrado un mayor efecto inhibitorio en quitosanos con DA 25 % frente a otros más desacetilados (DA 10 %), sugiriendo que la relación entre el efecto antibacteriano y bajos valores de DA no es tan clara (Park *et al.*, 2004). En este caso, los resultados procedentes de una caracterización más detallada, demostraron que parece necesaria cierta proporción de moléculas acetiladas para que se produzca un efecto inhibitorio más potente en ambos microorganismos.

Este hecho podría estar relacionado con el mecanismo de acción antibacteriano de estos COS, es decir cómo se está produciendo la penetración de los oligómeros a través de la pared celular y las interacciones electroestáticas que están sucediendo entre estos y las biomoléculas de la superficie celular. Puesto que COS 1 P2 está constituido por una mayor abundancia de moléculas completamente desacetiladas, y por tanto, presenta mayor cantidad de grupos catiónicos en disolución, se podrían estar produciendo fuerzas de repulsión más intensas en este caso que en el COS 1 P1 (Schatz *et al.*, 2003a), produciéndose menor número de interacciones electroestáticas entre los oligómeros y la superficie celular, e incluso menor posibilidad de penetración en la célula, y por tanto un menor efecto antibacteriano por parte de este COS 1 P2.

Por otro lado, la presencia de HMF que se había detectado en todos los productos del P2, y su posible efecto bactericida frente a un amplio espectro de microorganismos (Nafea *et al.*, 2011), pusieron de manifiesto que el posible efecto que pudiera estar causando este HMF sería mínimo. Asimismo, también está descrito un efecto inhibidor del crecimiento bacteriano por parte de AGEs derivados de quitosanos, debido a su naturaleza catiónica y a su capacidad para desestabilizar la permeabilidad de membrana plasmática (Miralles *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2005). Por ello, los posibles AGEs presentes en los COS del P2 como consecuencia del avance la Reacción de Maillard, podrían estar provocando cierto efecto inhibidor del crecimiento bacteriano, aunque dicho efecto se estaría produciendo en menor medida, puesto que estas muestras no fueron las más activas.

Aunque esta distribución de DP que se ha descrito (Fig. IV.15) no fue el tamaño molecular real que se utilizó para testar la actividad antibacteriana, parece necesario un tamaño molecular mínimo ($M_w > 5$ kDa) entre \overline{M}_w 5,64 y 17,21 kDa para que se produzcan interacciones electrostáticas entre los COS y la superficie celular, y con ello inhibición del crecimiento bacteriano. Además estas fuerzas deben predominar sobre las posibles fuerzas de repulsión que se puedan producir debido a la alta desacetilación. Este hecho estaría indicando la necesidad de un balance entre el M_w de la mezcla de COS y la abundancia de oligómeros acetilados, para poder utilizar estos COS como potenciales agentes antibacterianos.

Conclusiones parciales

- Los COS procedentes del P1 con un \overline{M}_w de 5,64 y 17,21 kDa presentaron mayor capacidad para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* y de *Listeria Monocytogenes* con respecto a los COS procedentes del P2 (\overline{M}_w entre 2,7 y 8,6 kDa).
- *E. coli* fue más susceptible que *L. monocytogenes* a la presencia de COS.
- El COS 1 P1 en cuyos productos de hidrólisis se detectó un 27 % de oligómeros A0 y la predominancia de secuencias acetiladas (25 % A1; 24 % A2; 18% A3; 5% A4) inhibió completamente el crecimiento de *E. coli* y *L. monocytogenes* a 5 mg/ml y 10 mg/ml respectivamente. Sin embargo, el COS 1 P2 en cuyos productos de hidrólisis predominaron los oligómeros A0 (63 %) presentó un MIC de 10 mg/ml para ambos microorganismos.
- En el posible mecanismo de actividad antimicrobiana parece necesario un balance entre oligómeros acetilados de M_w intermedio y oligómeros completamente desacetilados. Dicho balance favorecerá la predominancia de interacciones electroestáticas con la superficie celular, independientemente de la cepa microbiana, y puesto que se trata de mezclas heterogéneas de COS, no excluiría la posible penetración de oligómeros de menor M_w al interior celular.

3.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE LOS COS

En las últimas décadas se han producido grandes avances en el conocimiento de las bases moleculares de enfermedades relacionadas con daño oxidativo, el cual se produce como consecuencia de una sobreproducción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y una deficiencia de antioxidantes (Bhat *et al.*, 2015). Los ROS provocan daños en las biomoléculas celulares causando cambios estructurales y funcionales, los cuales pueden desembocar en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Czerska *et al.*, 2015). Los antioxidantes como los COS presentan buena capacidad de atrapamiento de radicales libres y son capaces de prevenir el daño oxidativo interrumpiendo la reacción de oxidación ocasionada por la presencia de estos, protegiendo así al organismo del deterioro generado por los radicales (Ngo *et al.*, 2011a). En general, en el caso de los COS, esta capacidad antioxidante se ha relacionado con amplios rangos de valores de DA y con el bajo M_w de las fracciones (Mengíbar *et al.*, 2013; Ngo *et al.*, 2011b). Se relaciona a los COS, por su gran potencial como agentes antioxidantes naturales, con el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo, incluidas enfermedades cardiovasculares, degenerativas o cáncer (Ngo *et al.*, 2015). Por ello se hace interesante profundizar en el estudio de la composición de estos productos intentando definir de manera más precisa las características fisicoquímicas necesarias para que desempeñen su función.

Puesto que la reacción de oxidación/antioxidación implica diferentes mecanismos de acción, los cuales se pueden evaluar mediante diferentes métodos (Huang *et al.*, 2005), se emplearon cuatro métodos distintos con el propósito de obtener una información más profunda y completa. La determinación de la actividad antioxidante se llevó a cabo para los COS procedentes de QsA y QsB mediante los tres procesos de obtención.

3.2.1. Evaluación de la capacidad para atrapar radicales libres ABTS y DPPH

Los métodos de determinación de atrapamiento de radicales libres DPPH y ABTS son análisis rápidos, reproducibles, económicos y muy adaptables para evaluar el poder antioxidante de polisacáridos (Fan *et al.*, 2009). En la Figura IV.16 se muestra la capacidad para atrapar radicales libres ABTS y radicales libres DPPH que presentaron los COS expresada en valores TEAC, es decir en microequivalentes (μEq) de Trolox por gramo de muestra. En los COS procedentes de QsA, el valor TEAC para la capacidad de atrapar radicales libres ABTS varió entre 21 y 52 μEq de trolox/g de COS (Fig. IV.16A). En los COS procedentes de QsB, el valor

TEAC para la capacidad de atrapar radicales libres ABTS varió entre 23 y 37 μEq de trolox/g de COS (Fig. IV.16B). En cuanto al valor TEAC para la capacidad de atrapar radicales DPPH, en los COS procedentes de ambos quitosanos, este varió entre 3 y 12 μEq trolox/g de COS (Fig. IV.16). La capacidad para atrapar radicales libres ABTS fue superior a la capacidad de atrapar radicales libres DPPH en todos los COS. En general, se comprobó que la actividad antioxidante en cuanto al atrapamiento de radicales libres DPPH y ABTS mostró una tendencia a aumentar conforme disminuía el M_w de las fracciones de COS.

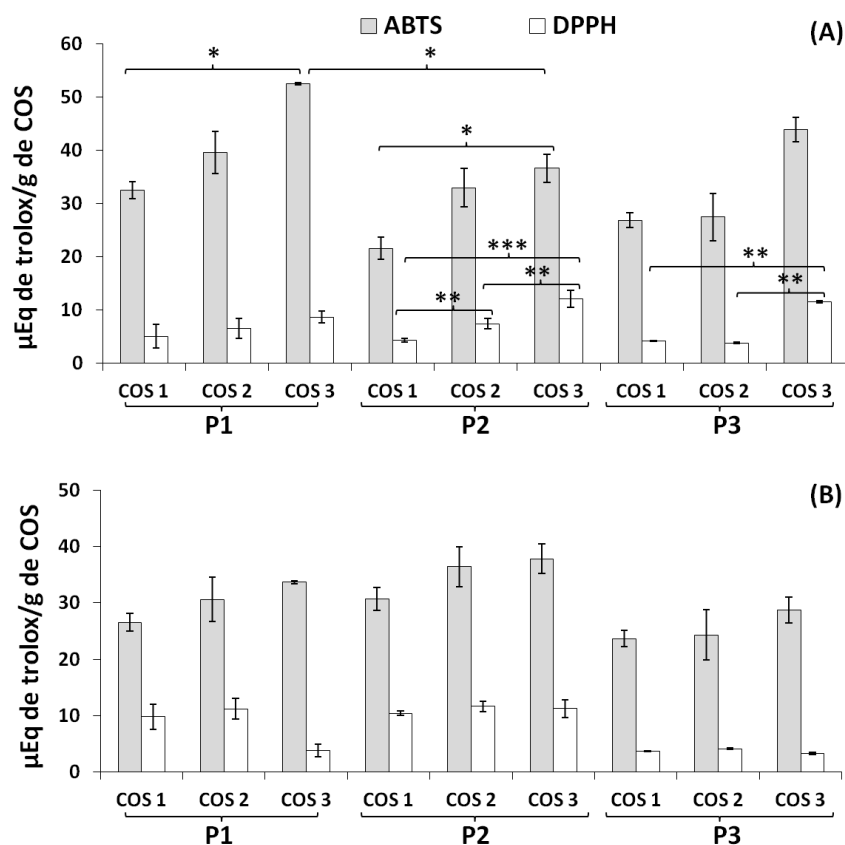


Figura IV.16. Capacidad para atrapar radicales libres ABTS y DPPH de los COS obtenidos mediante P1, P2 y P3 a partir de QsA (A) y QsB (B). Se expresa el promedio del valor TEAC (μEq de trolox por gramo de COS) de 3 experimentos independientes ($n = 3$) \pm el error típico y el nivel del significación ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***). No se encontraron diferencias significativas en el valor TEAC de los COS procedentes de QsB

Respecto a la capacidad de atrapamiento de radicales ABTS de los COS procedentes de QsA (Fig. IV.16A), se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) de los valores TEAC de los COS 3 respecto a los COS 1 en el caso del P1 y P2, demostrándose la clara influencia del menor M_w para el desarrollo de un mejor atrapamiento de radicales libres. Sin embargo, aunque en el P3 se observó una mayor capacidad antioxidante de COS 3 respecto a COS 1, no se observaron diferencias significativas conforme disminuía el M_w . Al comparar las fracciones que

presentaron mayor actividad entre sí, el COS 3 P1 mostró mayor capacidad antioxidante respecto a COS 3 P2 ($p < 0,05$), y respecto a COS 3 P3. Por otro lado, respecto a los COS procedentes de QsB (Fig. IV.16B), no se observaron diferencias significativas en los valores TEAC dentro de cada proceso. Al comparar las fracciones más antioxidantes entre sí, el COS 3 P2 fue el que mayor capacidad mostró, aunque las diferencias no fueron significativas respecto a los COS 3 de los otros dos procesos. Estos resultados demostraron que los COS 3 P1 procedentes de QsA fueron las fracciones con mayor capacidad de atrapamiento de radicales libres ABTS.

Respecto a la capacidad de atrapamiento de radicales DPPH de los COS procedentes de QsA (Fig. IV.16A), se observó un aumento significativo de los valores TEAC de los COS 3 respecto a los COS 1 en el caso del P2 ($p < 0,001$) y P3 ($p < 0,01$), demostrándose de nuevo la clara influencia del menor M_w para el desarrollo de un mejor atrapamiento de radicales libres. Sin embargo, aunque en el P1 se observó una mayor capacidad antioxidante de COS 3 respecto a COS 1, no se observaron diferencias significativas conforme disminuía el M_w . Al comparar las fracciones con mayor actividad (COS 3) entre sí, no se vieron diferencias significativas entre ellas. Por otro lado, respecto a los COS procedentes de QsB (Fig. IV.16B), no se observó la tendencia de aumento conforme disminuía el M_w , siendo los COS 2 las fracciones más activas dentro de cada proceso, aunque no de manera significativa.

En definitiva, respecto a la capacidad de atrapamiento de radicales ABTS, en ambos quitosanos, los COS 3 fueron las fracciones con mayor actividad, siendo más activos los procedentes de QsA respecto a los procedentes de QsB. Respecto a la capacidad de atrapamiento de radicales DPPH, se observó este mismo comportamiento, y los COS 3 obtenidos a partir de QsA fueron también las fracciones más activas. No sucedió lo mismo con los COS procedentes de QsB, los cuales no mostraron un aumento de la actividad conforme disminuyó el M_w .

3.2.2. Evaluación del poder reductor (FRAP)

En la Figura IV.17 se muestra la capacidad de poder de reducción de los COS expresada en TEAC. En los COS procedentes de QsA, el poder reductor osciló entre 3 y 30 μEq de trolox/g de COS (Fig. IV.17A). En los COS procedentes de QsB, esta capacidad osciló entre 6 y 77 μEq de trolox/g de COS (Fig. IV.17B). En general, se observó que la capacidad de reducir iones Fe^{3+} aumentó a medida que disminuyó el M_w de los COS, resultado que coincidió con el comportamiento observado previamente mediante los otros métodos de evaluación de la capacidad antioxidante.

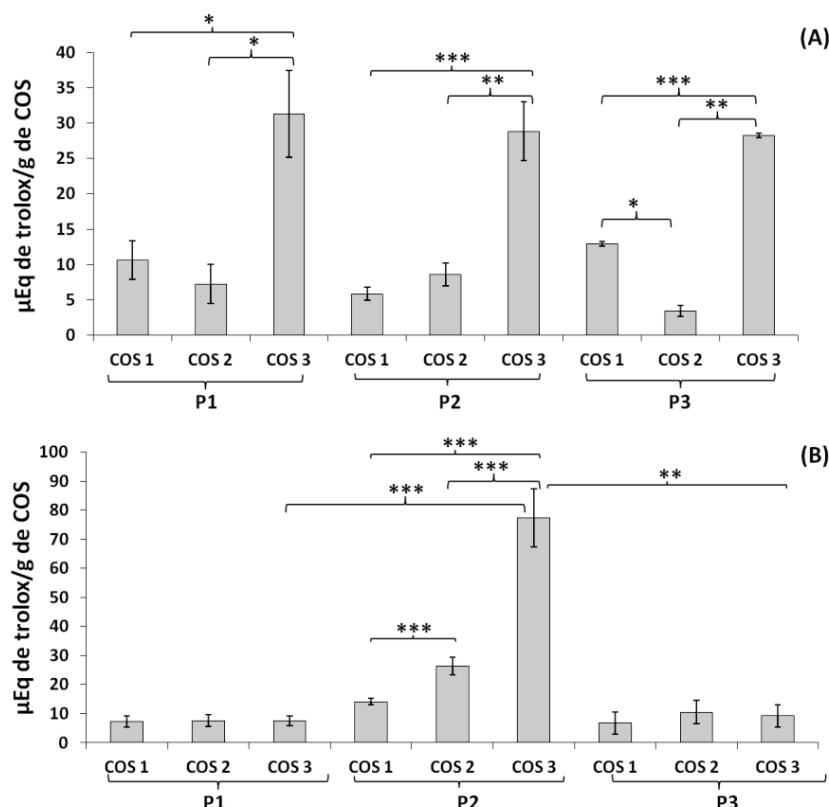


Figura IV.17. Capacidad reductora de los COS obtenidos mediante P1, P2 y P3 a partir de QsA (A) y QsB (B). Se expresa el promedio del valor TEAC (μEq de trolox por gramo de COS) de 3 experimentos independientes ($n = 3$) \pm el error típico y el nivel de significación ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

En los COS procedentes de QsA (Fig. IV.17A) se observó un aumento significativo de la capacidad reductora de los COS 3 respecto a COS 1 en el caso del P1 ($p < 0,05$), del P2 ($p < 0,001$) y del P3 ($p < 0,001$), demostrándose de nuevo la clara influencia del menor M_w para el desarrollo de una mejor capacidad reductora. En los COS procedentes de QsB (Fig. IV.17B) se obtuvo una mayor capacidad reductora para los COS 3 procedentes de P2, y este nivel fue significativo respecto a los COS 2 de mayor M_w de su mismo proceso ($p < 0,001$), y respecto a los COS 3 de los otros dos procesos ($p < 0,001$), para cuyos COS destacó la no variación del poder reductor en función del M_w .

3.2.3. Evaluación de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)

En la Figura IV.18 se muestra la capacidad de absorción de radicales del oxígeno de los COS expresada en TEAC. En los COS procedentes de QsA, la capacidad ORAC osciló entre 27 y 127 μEq de trolox/g de COS (Fig. IV.18A). En los COS procedentes de QsB, esta capacidad osciló entre 20 y 195 μEq de trolox/g de COS (Fig. IV.18B). En general, se observó un aumento de esta capacidad a medida que disminuyó el M_w de los COS, hecho que coincidió con la tendencia observada en los análisis anteriores.

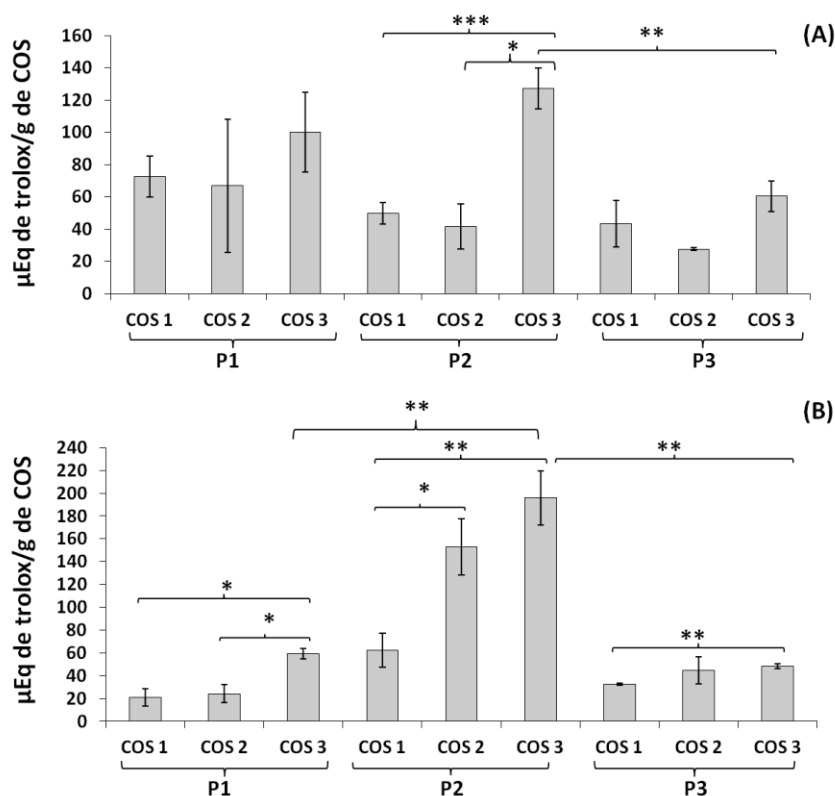


Figura IV.18. Capacidad de absorción de radicales del oxígeno de los COS obtenidos mediante P1, P2 y P3 a partir de QsA (A) y QsB (B). Se expresa el promedio del valor TEAC (μEq de trolox por gramo de COS) de 3 experimentos independientes ($n = 3$) \pm el error típico y el nivel del significación ($p < 0,05$ *; $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ ***).

En las fracciones procedentes de QsA (Fig. IV.18A) se obtuvo un mayor valor TEAC para los COS 3 respecto a los otros COS de mayor M_w , y este aumento fue significativo en P2 en el caso de COS 3 respecto a COS 2 ($p < 0,05$) y respecto a COS 1 ($p < 0,001$). Al comparar las fracciones más activas entre sí (COS 3), el COS 3 P2 mostró mayor capacidad antioxidante respecto a COS 3 P3 ($p < 0,01$), y respecto a COS 3 P1. En los COS procedentes de QsB (Fig. IV.18B) se observó un aumento significativo de los valores TEAC de los COS 3 respecto a los otros COS de mayor M_w en P1 ($p < 0,05$), en P2 ($p < 0,01$) y en P3 ($p < 0,01$). Al comparar las fracciones más activas entre sí (COS 3), destacó el COS 3 P2, el cual presentó significativamente una mayor capacidad antioxidante respecto a COS 3 P1 ($p < 0,01$) y respecto a COS 3 P3 ($p < 0,01$).

En definitiva, los COS 3 procedentes de ambos quitosanos presentaron la mejor capacidad ORAC, destacando el COS 3 P2 procedente de QsB, cuya actividad sobresalió al comparar con el resto de los COS. Este resultado para el COS 3 P2 coincidió con el resultado en cuanto a poder reductor (FRAP) para esta fracción, comentada en el apartado anterior.

3.2.4. Relación entre la capacidad antioxidante de los COS y sus características fisicoquímicas

Los métodos empleados para el estudio de la actividad antioxidante de un compuesto con elevado potencial para ser aplicado en diferentes áreas, necesitan ser representativos de las condiciones en las cuales este antioxidante ejercerá su efecto protector, de ahí la importancia de utilizar diferentes métodos para evaluar dicha capacidad. En general, todos los resultados obtenidos demostraron la estrecha relación entre la capacidad antioxidante y el M_w de los COS, relación que también se ha establecido en otros estudios (Huang *et al.*, 2012; Tomida *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2001). Por otro lado se demostró que el DA también ejerce un papel importante en esta capacidad, hecho que se puso de manifiesto con la baja capacidad antioxidante obtenida para algunos de los COS del P3 (DA ~ 40 %) mediante algunos métodos. Estos resultados reflejaron la influencia del DA a la hora de evaluar la capacidad ORAC así como el poder reductor, y no se encontró una influencia tan clara en el atrapamiento de radicales libres DPPH y ABTS.

Respecto a los COS con mayor poder antioxidante (COS 3, $M_w < 5$ kDa), se pretendió establecer una relación con la composición intramolecular y con la abundancia de oligómeros completamente desacetilados. En la Tabla IV.8 se resumen los valores TEAC de los COS más activos así como su composición intramolecular respecto a la abundancia de oligómeros A0 (véase Tabla IV.5 para ver la composición en detalle) y sus características fisicoquímicas.

Tabla IV.8. Capacidad antioxidante (TEAC, $\mu\text{Eq trolox/g}$ de COS) de las fracciones de COS más activas y sus características fisicoquímicas. (1) Determinado mediante $^1\text{H-RMN}$. (2, 3) Determinado mediante espectroscopia de masas MALDI-TOF.

QsA	TEAC ($\mu\text{Eq trolox/g COS}$)				DA (%) ¹	Rango DP ²	Abundancia de oligómeros A0 (%) ³
	ABTS	DPPH	FRAP	ORAC			
COS 3 P1	52,54	8,71	31,29	100,10	12	4 - 11	77
COS 3 P2	36,64	12,12	27,84	127,33	13	4 - 11	88
COS 3 P3	43,88	11,51	28,25	60,35	42	5 - 12	0
QsB							
COS 3 P1	33,63	3,85	7,52	59,13	10	4 - 9	43
COS 3 P2	37,81	11,29	77,44	195,83	10	5 - 11	78
COS 3 P3	28,73	3,27	9,22	48,2	31	3 - 15	30

Atrapamiento de radicales libres DPPH y ABTS

Los métodos de atrapamiento de radicales DPPH y ABTS están clasificados como métodos SET, ya que evalúan la capacidad de un compuesto antioxidante para ceder electrones y con ello neutralizar los radicales libres DPPH y ABTS (Huang *et al.*, 2005). En este contexto, Je *et al.*, (2004) observaron una mayor capacidad para atrapar radicales DPPH por parte de COS < 5 kDa, DA 10 %, respecto a COS con DA superiores (DA 25 % ó 50 %). De igual manera, Park *et al.*, (2003) definieron una tendencia similar respecto al atrapamiento de radicales DPPH para COS de 1-3 kDa, describiendo además un efecto antioxidante dependiente de la dosis. Los resultados expuestos anteriormente concuerdan con los resultados de la bibliografía en cuanto al M_w , mostrando además una buena capacidad de atrapamiento de radicales DPPH y ABTS para mezclas de COS con DA ~ 46 %.

En mezclas heterogéneas de COS, esta capacidad para donar electrones está relacionada con los grupos hidroxilo de los C-2, C-3 y C-6 del anillo de piranosa (Xie *et al.*, 2001). En general, se ha descrito que esta actividad se potenciaría cuando la conformación espacial de las moléculas de COS no formasen agregados ni fuertes puentes de hidrógeno intra- e intermoleculares que ocupasen sus grupos hidroxilos, comportamiento que se ve favorecido a medida que disminuye el M_w (Feng *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2006). En este contexto, también se ha propuesto la posible participación de los grupos amino transfiriendo un electrón al radical DPPH y estabilizándolo, influyendo en esta reacción la densidad de la nube electrónica de los COS (Chen *et al.*, 2009).

En este estudio no queda tan clara la influencia del DA de los COS, mientras que sí fue más evidente la marcada influencia de M_w . Aunque algunos autores han definido valores de DA para los que se desarrolla una mejor actividad antioxidante (Je *et al.*, 2004; Park *et al.*, 2004), otros autores han encontrado que esta capacidad de atrapamiento de radicales libres DPPH no se ve afectada de manera significativa por el DA (Mengíbar *et al.*, 2013; Jung *et al.*, 2012; Yen *et al.*, 2008). Estos resultados coinciden con los que se han obtenido en este estudio, habiéndose demostrado también el mismo efecto para el caso de los radicales ABTS.

Por tanto, puesto que mediante P3 se obtuvieron COS con elevado DA que presentaron oligómeros con hasta 6 y 10 acetilaciones, y su capacidad de atrapamiento de radicales de este tipo no disminuyó de manera significativa respecto a otros COS de menor DA, se podría concluir que los grupos hidroxilo ejercerían una mayor participación en el atrapamiento de

este tipo de radicales, cediendo electrones al radical libre y neutralizándolo, sin excluir la posible contribución de los grupos amino, como han sugerido otros autores.

Por otra parte, basándonos en los resultados expuestos se plantea la posible participación de los grupos aldehído de los extremos reductores ocupados por unidades D en los mecanismos de atrapamiento de radicales libres. Esto conllevaría a ese aumento observado en la capacidad de atrapamiento de radicales por parte de los COS procedentes de QsB mediante P2.

Respecto a la presencia de AGEs en los productos del P2 y su posible participación en la actividad antioxidante (Jung *et al.*, 2014; Rao *et al.*, 2011), se consideraría mínima en los COS procedentes del QsA, puesto que su capacidad de atrapamiento de radicales DPPH y ABTS no se ve incrementada respecto a los productos de P1 o P3. En el caso de los COS procedentes de QsB, sí se observó un ligero aumento en la capacidad de atrapamiento de radicales respecto a los otros procesos, pero no quedaría claro si la participación de estos compuestos es influyente o no (Fig. IV.16).

En cuanto a las diferencias entre QsA y QsB, la diferente conformación espacial entre ambos quitosanos que ya se ha supuesto anteriormente, contribuiría a que hubiese diferente accesibilidad de los grupos funcionales responsables de provocar esta actividad. Aun así es evidente la mayor capacidad antioxidante por parte de los COS de $M_w < 5$ kDa pudiendo estas presentar un amplio rango de DA (10 – 42 %). Si se comparan COS similares en cuanto a M_w , se corrobora, por las diferencias encontradas, que parece que la conformación espacial que adopten las moléculas de quitosano en disolución y el equilibrio que se produzca entre las interacciones electroestáticas e hidrofóbicas, influirán en la accesibilidad por parte de los grupos funcionales hacia los radicales libres de DPPH y ABTS, provocando ello que en algunos casos no se correspondan las fracciones de menor M_w con las que más actividad desarrollen, como es el caso de los COS 3 procedentes de QsB, cuya capacidad de atrapamiento de radicales DPPH fue inferior a la de los COS 2.

Respecto a la capacidad de atrapamiento de radicales ABTS, como se ha comentado anteriormente, no hubo diferencias significativas en los valores TEAC de los COS 3 de P1 y P3 procedentes de QsA o QsB. Una tendencia similar se observó en los valores TEAC respecto a la capacidad de atrapamiento de radicales DPPH. Por ello, teniendo en cuenta la composición intramolecular, se vuelve a comprobar que fracciones que presentan desde el 0% hasta el 88% de oligómeros A0, son capaces de mostrar actividad antioxidante, corroborándose de nuevo la

mayor participación de los grupos hidroxilo en el atrapamiento de radicales libres de esta naturaleza.

Poder reductor

El método FRAP también se clasifica, al igual que los dos anteriores, dentro de los métodos que evalúan la capacidad reductora mediante la transferencia de electrones (Huang *et al.*, 2005). En los resultados expuestos referentes al poder reductor, se observó un efecto distinto según los COS procedieran del QsA o del QsB (Fig. IV.17). Teniendo en cuenta los valores TEAC de los COS procedentes de QsA, se vuelve a ver la marcada influencia del menor M_w , y la influencia menos clara del DA, hecho que se observó también en la capacidad de atrapamiento de radicales libres ABTS y DPPH (Fig. IV.16A). Sin embargo esta tendencia no se observó en los COS procedentes de QsB, en los cuales destacó la escasa capacidad de poder reductor de las fracciones procedentes de P1 y P3, aunque fue destacable el alto poder reductor de los COS 3 P2. Por otro lado, también podría estar teniendo lugar una contribución por parte de los extremos reductores, los cuales podrían estar más accesibles para la donación de electrones en el caso de COS procedentes de QsB, debido a menor longitud de sus cadenas. En COS 3 P2 tanto de QsA como de QsB, la presencia de AGEs podría estar contribuyendo a este mayor poder de reducción, como ya se había descrito para AGEs derivados de COS (Jung *et al.*, 2014).

Mediante el método FRAP se evaluó la capacidad de los COS para reducir el Fe^{3+} a Fe^{2+} . En esta reacción, las moléculas de COS se comportarían cediendo electrones y esto se traduce en la inhibición de la formación de un fuerte prooxidante como son los iones Fe^{3+} . Además, es necesario tener presente la capacidad quelante por parte de moléculas de quitosano para algunos iones de metálicos (Xue *et al.*, 1998). Esta capacidad de quelar iones Fe^{2+} por parte del quitosano está relacionada de manera indirecta con la capacidad de atrapamiento de radicales hidroxilo, así como a la capacidad de donar protones desde los grupos hidroxilo y amino de las moléculas de quitosano (Huang *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005). Por ello, habría que considerar que podría existir una posible interferencia en el método al provocarse quelación de Fe^{2+} por parte del quitosano. Aun así se consideró que la tendencia en el comportamiento entre las diferentes muestras se mantendría.

Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC)

Mediante este método, clasificado dentro de los métodos HAT puesto que evalúa la capacidad donadora de átomos de hidrógeno (Huang *et al.*, 2005), se evaluó la capacidad de absorción de radicales del oxígeno. Además de haber vuelto a observar influencia del M_w de los COS, cabe señalar la marcada actividad antioxidante que se obtuvo para los COS procedentes de P2, tanto en QsA como en QsB. Por otro lado, en este análisis tampoco se encontraron diferencias significativas entre los COS obtenidos a partir de P1 y P3, demostrándose de nuevo una gran participación de los grupos OH mediante donación de protones, y no observándose siempre una influencia clara del DA, a diferencia de lo observado por otros autores en el atrapamiento de radicales de oxígeno (Je *et al.*, 2004). Sin embargo, no ocurrió lo mismo para los COS procedentes de P2, encontrándose diferencias significativas entre las fracciones más activas de P2 (COS 3), respecto a las fracciones de COS 3 de P1 y P3, tanto en el QsA como en el QsB (Fig. IV.18).

Respecto a la composición intramolecular de las fracciones más activas (COS 3), se observó una clara relación entre mayor actividad ORAC y mayor abundancia de oligómeros A0 (Tabla IV.8), obteniéndose una mayor actividad por parte del COS con un 78 % de oligómeros A0. Este resultado reflejaría la posible participación de los grupos amino libre donando protones con la consiguiente neutralización de los radicales libres del oxígeno, pudiendo producirse reacciones de adición como proponían Xie *et al.*, (2001).

Hay que resaltar que los productos de hidrólisis del P2 presentaban mayor abundancia de extremos reductores ocupados por unidades D (Fig. IV.4) respecto a los productos de P1 y P3. Sin embargo, en concreto en la fracción de COS 3 se observó que la señal de 5,4 ppm, correspondiente a los extremos reductores ocupados por unidades D era menos intensa respecto a las fracciones de mayor M_w (COS 1 y COS 2), al igual que la señal de HMF, que como ya se comentó, se atribuyó a la formación de AGEs. Por un lado, Zhao *et al.*, (2013) demostraron que el HMF presentaba capacidad antioxidante en el atrapamiento de radicales DPPH, radicales ABTS e inhibiendo la oxidación producida por ROS, mostrando un efecto dependiente de la dosis (0,2 – 6,4 mM). Aun así, en cuanto a la capacidad ORAC, se podría relacionar en este caso con una mayor evolución hacia la formación de AGEs frente a una menor presencia de HMF, ya que estos productos también han sido estudiados por su capacidad antioxidante (Jung *et al.*, 2014; Chung *et al.*, 2005). Este hecho también se podría relacionar con la mayor actividad antioxidante que se vio en el COS 2 P2 procedente de QsB,

puesto que para esta fracción también se comprobó la presencia de estos compuestos fluorescentes en altos niveles comparado con el resto de fracciones (Fig. IV.6).

Correlación entre ensayos

Con el fin de correlacionar los resultados obtenidos con los diferentes métodos de análisis, se llevó a cabo un análisis de regresión lineal para calcular el coeficiente de correlación (R) entre los COS de cada proceso para cada pareja de métodos comparados (Tabla IV.9).

Tabla IV.9. Coeficiente de correlación (R) entre ensayos de capacidad antioxidante para cada uno de los procesos de obtención de COS a partir de cada quitosano.

QsA P1	DPPH	ORAC	FRAP	QsB P1	DPPH	ORAC	FRAP
ABTS	0,9978	0,8664	0,8849	ABTS	-0,7118	0,8637	0,8455
DPPH		0,8315	0,8521	DPPH		-0,9688	-0,2268
ORAC			0,9993	ORAC			0,4611
QsA P2	DPPH	ORAC	FRAP	QsB P2	DPPH	ORAC	FRAP
ABTS	0,9202	0,6234	0,7636	ABTS	0,8935	0,9914	0,7822
DPPH		0,8797	0,9554	DPPH		0,8269	0,4191
ORAC			0,9809	ORAC			0,8571
QsA P3	DPPH	ORAC	FRAP	QsB P3	DPPH	ORAC	FRAP
ABTS	0,9976	0,8603	0,9129	ABTS	-0,7831	0,7557	0,2877
DPPH		0,8937	0,9391	DPPH		-0,1845	0,3703
ORAC			0,9935	ORAC			0,8446

En la Tabla IV.9 se puede observar que la mejor correlación ($1 > R > 0,9000$) entre parejas de métodos se obtuvo para los COS obtenidos a partir de QsA. En todos los procesos llevados a cabo en el QsA existió una buena correlación entre los ensayos de ABTS y DPPH, y se encontró poca correlación entre la capacidad de atrapar radicales de hidrógeno y la capacidad ORAC. La mejor correlación se obtuvo entre FRAP y el resto de los métodos en el caso de los COS obtenidos mediante P3. Estos resultados indican que cuando existe un DA alto en las muestras y por tanto una menor proporción de grupos amino libres, los grupos hidroxilo estarían influyendo de manera significativa en el desarrollo de la actividad antioxidante, contribuyendo por donación de electrones o de átomos de hidrógeno en los distintos mecanismos que se evaluaron.

Por otro lado, cuando el DA es más bajo (P1 y P2), el poder reductor (FRAP) correlacionó con la capacidad ORAC de manera positiva en P2, mecanismos en los que podrían estar influyendo de manera más significativa además de los grupos OH, un mayor porcentaje de grupos amino

libre, una mayor presencia de extremos reductores y de AGEs, como se había comentado anteriormente. En el caso de P1, también se obtuvo una buena correlación, indicando de nuevo la mayor influencia de otros grupos, como podrían ser los grupos amino y los extremos reductores en este caso en el que no cambió la composición como en P2. Esto mismo se corrobora con la baja correlación entre los métodos de atrapamiento de radicales DPPH y ABTS, en los que habría una mayor participación de los grupos OH, y la correlación con los métodos FRAP y ORAC que fue baja (en los COS de los procesos P1 y P2).

Este mismo comportamiento se vio reflejado en los resultados obtenidos para los COS procedentes de QsB, en los cuales no se ha obtenido una buena correlación entre métodos de evaluación de la capacidad antioxidante, pudiendo estar relacionado de igual manera por la diferente conformación de estas mezclas heterogéneas procedentes del QsB. Las diferencias en los distintos mecanismos de actividad antioxidante igualmente estarían influenciadas por la disposición espacial que adoptasen las cadenas en solución, ya que favorecería o entorpecería la accesibilidad de los grupos funcionales de las moléculas de quitosano.

Conclusiones parciales

En general, evaluando en global la capacidad antioxidante de todas las fracciones de COS, se puede concluir que los COS obtenidos a partir de QsA son más antioxidantes que los obtenidos a partir de QsB, y este hecho se comprobó mediante varios métodos de evaluación de SET y HAT. Una vez observada la influencia del M_w de los COS en el aumento de la capacidad antioxidante, se podría decir que la distribución de DP más favorable para potenciar la actividad antioxidante de estas mezclas heterogéneas de COS sería por debajo de DP 15, con el predominio de moléculas con DP intermedio (Fig. IV.12).

- El M_w de los COS es uno de los factores determinantes para el desarrollo de una buena capacidad antioxidante. En general son las fracciones de COS 3 ($M_w < 5$ kDa) las que presentaron mayor actividad en el atrapamiento de radicales ABTS y DPPH, en la capacidad ORAC y en el poder reductor (FRAP).
- En el atrapamiento de radicales libres ABTS y DPPH fueron efectivas fracciones de COS 3 con una abundancia de oligómeros A0 desde 0 a 88% obtenidas mediante distintos procesos, demostrándose por tanto una mayor participación por parte de los grupos hidroxilo mediante donación de electrones en el atrapamiento de radicales ABTS y DPPH. En el poder reductor se demostró una mayor influencia de extremos reductores

ocupados por unidades D y la presencia de AGEs en una mayor en el desarrollo de una mejor actividad, como se observó en los COS 3 P2.

- En la capacidad ORAC fueron los COS 3 P2 y con alto porcentaje de secuencias totalmente desacetiladas las más activas. Se demostró también la influencia de una mayor abundancia extremos reductores así como la presencia de compuestos AGEs en este mecanismo de donación de átomos de hidrógeno.
- Mediante correlación de métodos se observó que a valores altos de DA correlacionaron bien todos los métodos, demostrando la influyente participación de los grupos OH en todos los mecanismos ensayados. Cuando el DA fue más bajo correlacionan por un lado DPPH y ABTS, y por otro FRAP y ORAC corroborando mayor participación de OH en los primeros métodos, y por otro lado mayor influencia de grupos amino libre, además de extremos reductores ocupados por unidades D y la presencia de AGEs en este tipo de mecanismos.

3.3. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES MUCOADHERENTES DE LOS COS

Las propiedades mucoadherentes de polímeros naturales como el quitosano resultan muy atractivas ya que este polisacárido puede ser empleado en el desarrollo de transportadores de principio activos para su dosificación en el organismo durante tiempos prolongados (Harris *et al.*, 2013). En general, está establecido que quitosanos altamente desacetilados con un M_w medio-alto van a presentar una buena mucoadherencia (Aranaz *et al.*, 2014). Aun así se planteó en este capítulo el estudio de esta propiedad en las fracciones de COS de mayor M_w , con el objetivo de ver si se mantiene cuando el quitosano es sometido a distintos procesos de despolimerización.

Por ello, se evaluó si los COS 1 y los COS 2 procedentes de QsA mediante P1, P2 y P3 presentaban la propiedad de mucoadhesión. Este análisis se llevó a cabo mediante un método sencillo basado en los cambios de la carga eléctrica de superficie (potencial zeta, ζ) de un modelo de mucina cuando se produce interacción con el polímero, en este caso con los COS.

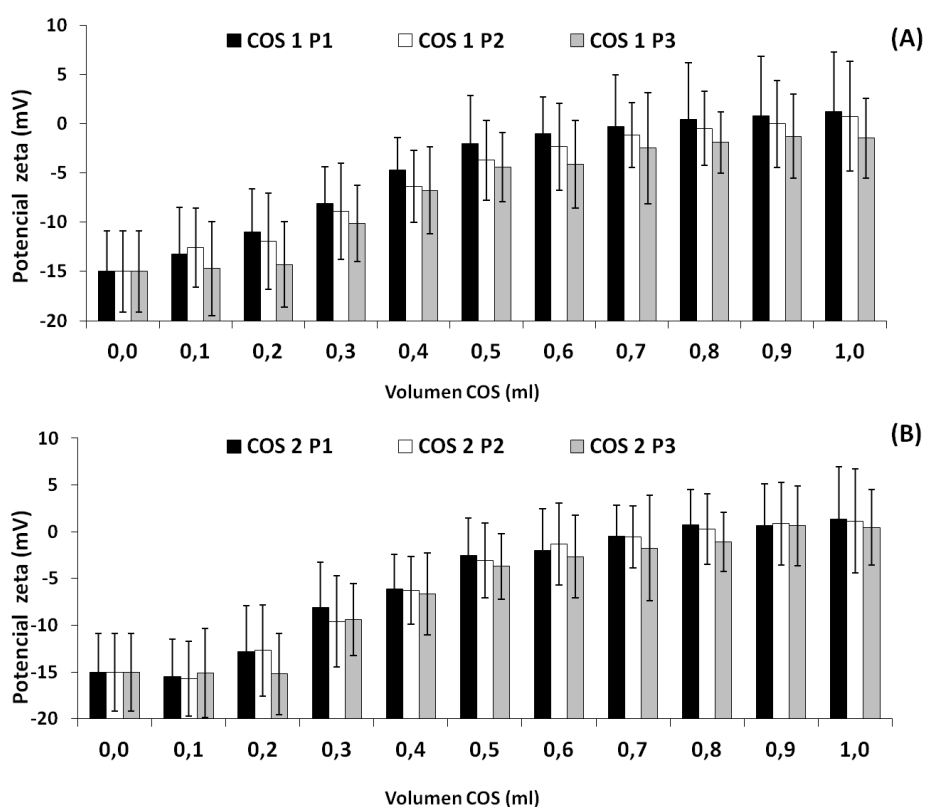


Figura IV.19. Variación del potencial zeta (ζ) de mezclas de mucina (10 mg/ml) y COS (2,5 mg/ml) en diferentes proporciones. Se expresa el valor promedio ($n = 3$) \pm la desviación estándar.

En la Figura IV.19 se muestra la evolución del potencial zeta de los complejos mucina-COS conforme fue aumentando la proporción de COS añadido sobre 1 ml de disolución de mucina. Los resultados mostraron que a medida que se adicionaba la solución de COS, aumentaba el potencial zeta de la mezcla, lo cual conllevó la neutralización de la carga neta de la mezcla e implicó la interacción entre las glicoproteínas de la mucina y los COS.

Para los COS 1 P1 y P2 se observó como este cambio en el potencial zeta empieza a ocurrir desde que se adicionan 0.1ml de la solución de COS sobre la mucina (Fig. IV.19A). Sin embargo, para los COS 1 P3, se observó cómo se necesitaba un mayor volumen de COS (0,3 ml) para empezar a producirse el cambio en el potencial zeta, lo que demostró la influencia del DA en este mecanismo de interacción.

En el caso de los COS 2 procedentes de los 3 procesos se observó que el incremento en el potencial zeta se inició a partir de la adición de 0,3 ml de polímero (Fig. IV.19B). Este hecho demostró que además de la influencia del DA, la disminución de M_w también influirá en la intensidad de la interacción, teniéndose que adicionar mayor proporción de solución de COS 2 para observar el cambio del potencial zeta.

Se establece que la pendiente correspondiente a la regresión lineal extraída de la variación del potencial zeta con respecto al volumen de polímero añadido permite calcular el volumen crítico del polímero (V_c), definido este como el volumen necesario para neutralizar el potencial negativo de la mucina (Jintapattanakit *et al.* 2008). Con el objetivo de comparar la propiedad de mucoadhesión de cada COS, se utilizó dicha regresión lineal y se calculó el volumen necesario para producir la completa neutralización de la mucina. Todos los resultados se resumen en la Tabla IV.10.

Tabla IV.10. Características de la interacción entre la mucina y los COS.

Muestra	Pendiente (mV/ml)	V_c (ml)
COS 1 P1	16,3	0,8
COS 1 P2	16,0	0,8
COS 1 P3	11,6	1,0
COS 2 P1	16,5	0,8
COS 2 P2	16,9	0,8
COS 2 P3	13,8	0,9

Respecto al M_w de los COS ensayados, no se observaron grandes variaciones en las pendientes calculadas, demostrándose que tanto los COS 1 P1 y P2 (\overline{M}_w 18,28 y 12,58 kDa respectivamente) como los COS 2 P1 y P2 (M_w 8,64 y 5,02 kDa respectivamente) presentaron buena mucoadhesión. Muanprasat *et al.*, (2015) han descrito una buena mucoadhesión para COS de 5 y 14 kDa en células epiteliales intestinales y han comprobado que se promueve la formación de uniones estrechas entre estas células de manera más eficaz con los COS de 5 kDa. En general, los COS procedentes de P1 y P2 presentaron mejor mucoadhesión que los COS procedentes de P3, como indicó el mayor valor de sus pendientes, aunque estas diferencias no fueron significativas. Estas muestras presentaron mayor capacidad para interaccionar fuertemente con las glicoproteínas de la mucina, y estas fuerzas decrecieron cuando el DA del COS era superior. Estas muestras (DA 11- 15 %) presentan una mayor densidad de carga estructural respecto a COS más acetilados, favoreciéndose una expansión de las cadenas en solución (Schatz *et al.*, 2003a), y por tanto favoreciéndose que se produzca la interacción con la mucina. Está descrito que las características fisicoquímicas del polímero van a afectar a la interacción entre este y la mucina, y por tanto definen su capacidad mucoadherente (Aranaz *et al.*, 2009). En concreto, el DA y M_w del polímero, así como las condiciones del microambiente van a definir las interacciones que se produzcan entre las glicoproteínas y los COS.

En cambio, se observó que las pendientes calculadas son menores cuando el DA del COS es superior (DA ~46 %), como puede observarse para COS 1 P3 y COS 2 P3. Para estas muestras además se necesitó un volumen crítico mayor para neutralizar el potencial de la mucina (1 ml y 0,9 ml respectivamente). En estos rangos de DA, las interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas se contrarrestan progresivamente (Schatz *et al.*, 2003a), por lo que la densidad de la nube electrónica será menor, lo que podría influir a que se produjera una menor interacción con la mucina. Con ello se demostró que el DA es un factor clave a la hora de producirse la interacción mucina-COS, ya que mientras menos grupos amino libre presente el COS menor será su posibilidad de interaccionar con la mucina, debido a la menor presencia de grupos catiónicos en disolución.

Respecto a la composición intramolecular de estos COS procedentes de P1 y P2, y como ya se ha observado en los COS 3 procedentes de QsA homólogos a estos procesos (Tabla IV.5), el aumento de los oligómeros A0 como consecuencia del P2 no influyó en la mucoadhesión de las fracciones, y este hecho se vio reflejado en la obtención de pendientes similares para estas muestras (Tabla IV.10). Por otro lado, la ausencia de oligómeros A0 que se observó en los COS

3, y en los COS 2 cuya composición se verá en el próximo apartado, procedentes de QsA homólogos a estos procesos (Tabla IV.5), pudo estar influyendo en la menor mucoadhesividad observada para estas muestras, como indicaron sus pendientes. Aunque estos COS procedentes del P3 necesitaron un volumen crítico mayor para neutralizar el potencial zeta de la mucina, esto no se tradujo en una ausencia de mucoadhesión por parte de estos COS.

Conclusiones parciales

- Los COS con un \overline{M}_w entre 5,02 y 18,28 kDa, DA entre 11 y 15 % y con la predominancia de oligómeros A0 presentaron fuerte mucoadhesión, siendo capaz de neutralizar el potencial zeta negativo de la mucina con 0,8 ml de solución de COS (2,5 mg/ml).
- Los COS con un \overline{M}_w entre 8,63 y 18,86 kDa, y un DA \sim 46 % con ausencia de oligómeros A0, presentaron menor mucoadhesión, necesitándose más cantidad de COS para neutralizar el potencial negativo de la mucina (1 ml y 0,9 ml respectivamente para COS 1 P3 y COS 2 P3).

3.4. EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES ANTIINFLAMATORIAS DE LOS COS

Existen algunos estudios en los que se plantea el efecto beneficioso de distintas mezclas de COS en relación a su capacidad antiinflamatoria, ya sea *in vivo* o *in vitro* (Azuma *et al.*, 2015; Chung *et al.*, 2012; Fernandes *et al.*, 2010). Sin embargo, en estos estudios es complicado encontrar parámetros fisicoquímicos de estos COS ya que suelen ser muestras pobremente caracterizadas. Esto genera confusión a la hora de comparar resultados entre sí, complicando la posibilidad de establecer hipótesis acerca de posibles mecanismos de acción.

En este trabajo de investigación se planteó el estudio del posible efecto antiinflamatorio de distintas fracciones de COS en función de su composición intramolecular. Para lograr este objetivo, se eligieron las muestras de COS 2 obtenidas a partir de QsA mediante P1, P2 y P3. Estas presentaban un M_w entre 5 y 10 kDa, coincidentes con los intervalos de M_w para los COS con propiedades antiinflamatorias descritas por otros autores (Lee *et al.*, 2009; Yousef *et al.*, 2012; Bahar *et al.*, 2012). Por otra parte, se seleccionaron las fracciones procedentes de QsA teniendo en cuenta la tendencia observada en relación a la composición intramolecular. Esta composición variaba desde un 0 % de oligómeros completamente desacetilados en COS 2 P3, hasta un mayor porcentaje en COS 2 P1 y COS 2 P2, existiendo una mayor variación en la composición con respecto a los COS procedentes del QsB.

A continuación se exponen los resultados obtenidos en cuanto al efecto antiinflamatorio de los COS 2 *in vivo* e *in vitro*. Por otra parte, se presentará el análisis de la composición intramolecular y distribución de DP de estos COS 2 procedentes de QsA, con el objetivo de encontrar relaciones con el posible comportamiento antiinflamatorio observado.

La evaluación del efecto antiinflamatorio de estos COS se ensayó *in vivo*, utilizando como modelo animal ratones de la cepa C57BL/6J, e *in vitro*, empleando la línea celular establecida Raw 264.7 (en adelante Raw), correspondiente a macrófagos peritoneales murinos. En el primer caso, se utilizó el modelo de inflamación aguda inducida por inyección intraperitoneal (IP) de lipopolisacárido (LPS). En el segundo caso, se indujo activación de la respuesta inflamatoria mediante la adición de LPS al medio de cultivo celular. En ambos casos se utilizó LPS procedente de *Salmonella typhimurium*, una especie de enterobacteria *gram* negativa causante de numerosas enfermedades. Este compuesto es uno de los elicitores más potentes del sistema inmune de organismos superiores y es el responsable de la inducción de citoquinas, quimioquinas y otros mediadores del sistema inmune (Ulevitch, 2000). Como se

apuntaba en la introducción, el LPS consta de tres partes, lípido A, región Core y antígeno O (Bone, 1996), y la activación de la respuesta inmune está asociada a la región del lípido A, la cual reaccionará con los receptores de membrana tipo TLR4 desencadenando la respuesta inmune del huésped (Peri *et al.*, 2010).

3.4.1. Estudio de la implicación de los COS en la respuesta inflamatoria *in vivo*

Para el abordaje experimental, se seleccionaron 8 grupos de ratones, cada uno formado por 6 ratones, a los cuales se les aplicó un tratamiento diferente mediante IP. Los distintos tratamientos se resumen en la Tabla IV.11. El grupo 1 se utilizó como referencia control de no inflamación o control negativo. El grupo 2 se utilizó como referencia control de inflamación o control positivo. A las dosis utilizadas no se observó mortalidad en ninguno de los grupos experimentales transcurridas 24 horas desde que se inició el tratamiento, tiempo al cual se analizó el reclutamiento de células inflamatorias a la cavidad peritoneal mediante citometría de flujo.

Tabla IV.11. Tratamiento aplicado a los distintos grupos de ratones. (1) LPS a 1 mg/kg de ratón. (2) COS a 10 mg/kg de ratón.

Grupo	Tratamiento intraperitoneal
1	PBS estéril
2	LPS ¹
3	LPS ¹ + COS 2 P1 ²
4	LPS ¹ + COS 2 P2 ²
5	LPS ¹ + COS 2 P3 ²
6	COS 2 P1 ²
7	COS 2 P2 ²
8	COS 2 P3 ²

Tras la extracción de los exudados peritoneales y la incubación de estos con un anticuerpo específico para el linaje celular de neutrófilos (Ly6G), esta población se pudo distinguir claramente del resto de células mediante citometría de flujo (Fig. IV.20). En la Figura IV.20E-F se resumen todos los resultados obtenidos una vez finalizado el análisis de todos los grupos experimentales. En el grupo 1 (control negativo) no se detectó población de neutrófilos, mientras que en los ratones del grupo 2 (control positivo) se observó una respuesta inflamatoria aguda con éxito respecto al control negativo. Este nivel de reclutamiento de neutrófilos hacia la cavidad peritoneal se consideró el 100 % de inflamación producida por LPS en las condiciones experimentales ensayadas. En el grupo 3 (LPS + COS 2 P1) se observó una

disminución significativa ($p < 0,001$) de la población de neutrófilos (48 ± 13 %) respecto al control positivo (Fig. IV.20E). Un comportamiento similar se observó en los ratones del grupo 5 (LPS + COS 2 P3), en los cuales el nivel de neutrófilos disminuyó significativamente ($p < 0,05$) hasta un 42 ± 18 % respecto al control positivo. En cambio, en los ratones del grupo 4 (LPS + COS 2 P2) no se observó una disminución significativa del nivel de neutrófilos, obteniéndose un 83 ± 23 % de neutrófilos respecto al control positivo. En definitiva, tanto COS 2 P1 como COS 2 P3, a diferencia de lo que ocurre con COS 2 P2, son capaces de inhibir parcialmente la inflamación aguda provocada por el efecto de un potente agente inflamatorio como es el LPS.

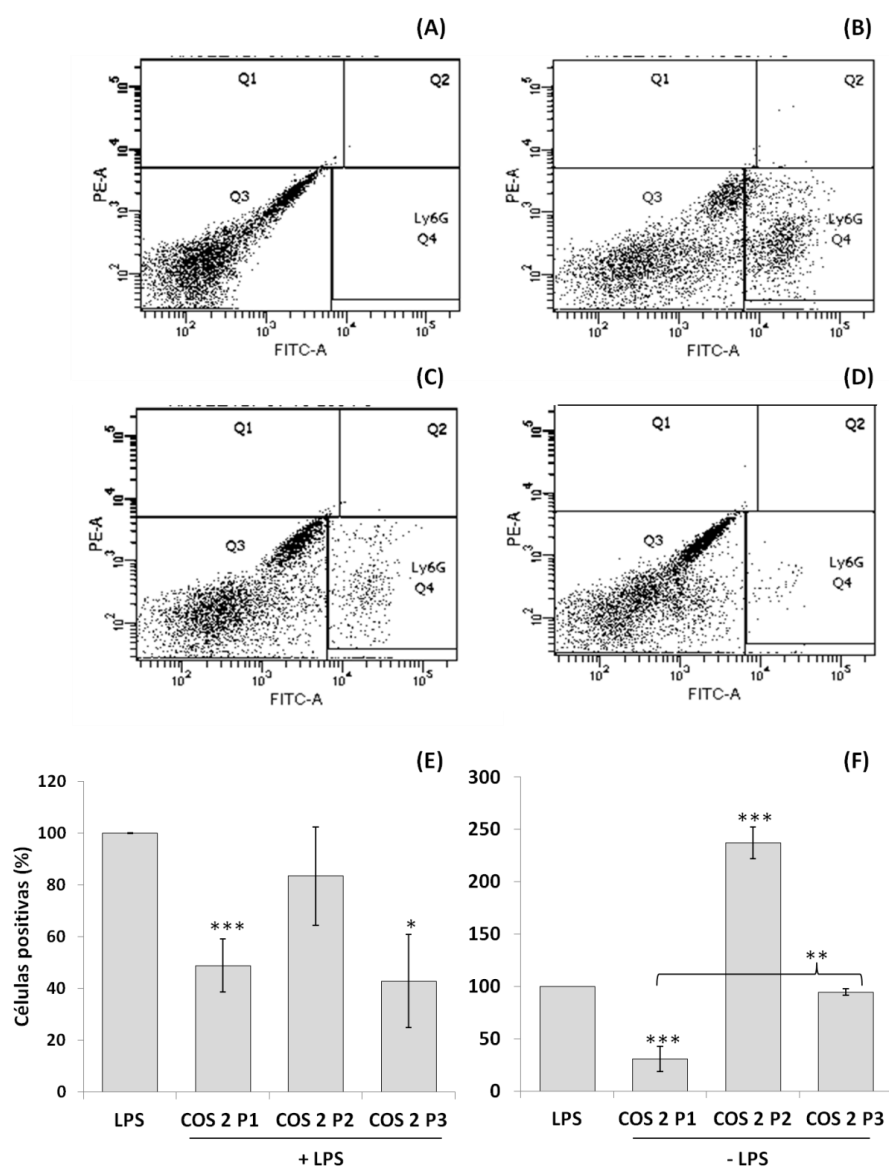


Figura IV.20. Población de neutrófilos, células positivas para el anticuerpo Ly6G, aislada del exudado celular peritoneal transcurridas 24 horas desde el inicio del tratamiento. (A-D) Imágenes de la distribución de la población de neutrófilos obtenida mediante citometría de flujo. Se muestra una imagen representativa de 6 experimentos independientes llevados a cabo. (A) Imagen representativa del grupo 1, control negativo. (B) Imagen representativa del grupo 2, control positivo (LPS 1 mg/kg de ratón). (C) Imagen representativa del grupo 3 (LPS 1 mg/kg + COS 2 P1 10 mg/kg de ratón). (D) Imagen

representativa del grupo 6 (COS 2 P1 10 mg/kg de ratón). (E) Representación gráfica de los resultados de los grupos de ratones 3, 4 y 5 a los cuales se les inyectó una mezcla de COS (10 mg/kg de ratón) y LPS (1 mg/kg de ratón), comparados con el control positivo (grupo 2, LPS). (F) Representación gráfica de los resultados de los grupos de ratones 6, 7 y 8 a los cuales se les inyectó COS (10 mg/kg de ratón) en PBS estéril y ausencia de LPS, comparados con el control positivo. (E-F) Las gráficas muestran la media ($n=6$) \pm el error típico de cada grupo de ratones y el nivel de significación ($p<0,05$ *, $p<0,01$ **, $p<0,001$ ***). El 100 % de inflamación (grupo 2, control positivo) se corresponde con un promedio de $2,1 \times 10^5$ células positivas $\pm 2,5 \times 10^4$ (error típico).

Una vez observado el efecto de los COS sobre la población de neutrófilos de la cavidad peritoneal originada como consecuencia del LPS, se analizó su efecto en ausencia de LPS. Para ello, a cada grupo de ratones se les inyectó una muestra de COS disuelta en PBS estéril (10 mg/kg de ratón). Los resultados mostraron un efecto diferente para cada uno de los COS ensayados (Fig. IV.20F). En el grupo 6 (COS 2 P1) se observó un aumento de la población de neutrófilos de un 30 ± 13 % respecto al control negativo. En el grupo 7 (COS 2 P2) se observó un aumento de la población de neutrófilos de hasta un 237 ± 15 % respecto al control negativo, y en el grupo 8 (COS 2 P3) se observó un aumento de la población de neutrófilos de un 97 ± 2 % respecto al control negativo. En definitiva, todos los COS ensayados produjeron cierto efecto pro-inflamatorio, el cual fue similar al efecto inflamatorio producido por el LPS en el caso de COS 2 P3, y más del doble en el caso de COS 2 P2. Sin embargo, en el caso de COS 2 P1 este efecto fue un 70 % inferior al efecto inflamatorio producido por el LPS.

Así como en los experimentos *in vivo* se ha estudiado si se producía reclutamiento de neutrófilos hacia la cavidad intraperitoneal, comparando el efecto de los COS con el efecto de una molécula de establecida actividad pro-inflamatoria como el LPS, nos planteamos realizar una serie de estudios *in vitro* con el objetivo de investigar que vías de señalización intracelulares pudieran estar modulando el efecto de los distintos COS. Para ello se utilizó la línea celular Raw de macrófagos peritoneales murinos, usada ampliamente para analizar efectos pro- y antiinflamatorios.

3.4.2. Estudio de la implicación de los COS en la respuesta inflamatoria *in vitro*

Los macrófagos poseen una plasticidad inherente para llevar a cabo diferentes programas de activación funcionalmente específicos según la naturaleza de las moléculas que se encuentran en los patógenos o en las células del huésped necrosadas, y en función de las citoquinas presentes en el microambiente inflamatorio (Moon *et al.*, 2011; Murray *et al.*, 2011). Tras el reconocimiento de patrones moleculares de patógenos (PAMPs), como el LPS, los macrófagos

se activan por la vía clásica (Van Ginderachter *et al.*, 2006), convirtiéndose en células efectoras que, a través de diferentes vías de señalización, terminarán expresando diferentes citoquinas y quimioquinas proinflamatorias. El LPS activa vías de señalización intracelulares a través de los receptores de reconocimiento de patógenos tipo toll (TLR), y concretamente actúa a través del TLR4.

3.4.2.1. Citotoxicidad de los COS en macrófagos Raw 264.7.

Primeramente se quiso determinar la posible toxicidad de los distintos COS 2 en las condiciones en las cuales se iba a determinar *in vitro* su posible acción anti-inflamatoria. Para ello se determinó la citotoxicidad de los COS 2 a diferentes concentraciones mediante el ensayo del MTT, ampliamente utilizado en el análisis rutinario de la citotoxicidad de numerosos compuestos. Las células metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT generando una sal, la cual al ser solubilizada da una medida colorimétrica que constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias, cuya actividad es interpretada como una medida de la viabilidad celular (Mosmann, 1983; Berridge *et al.*, 2005).

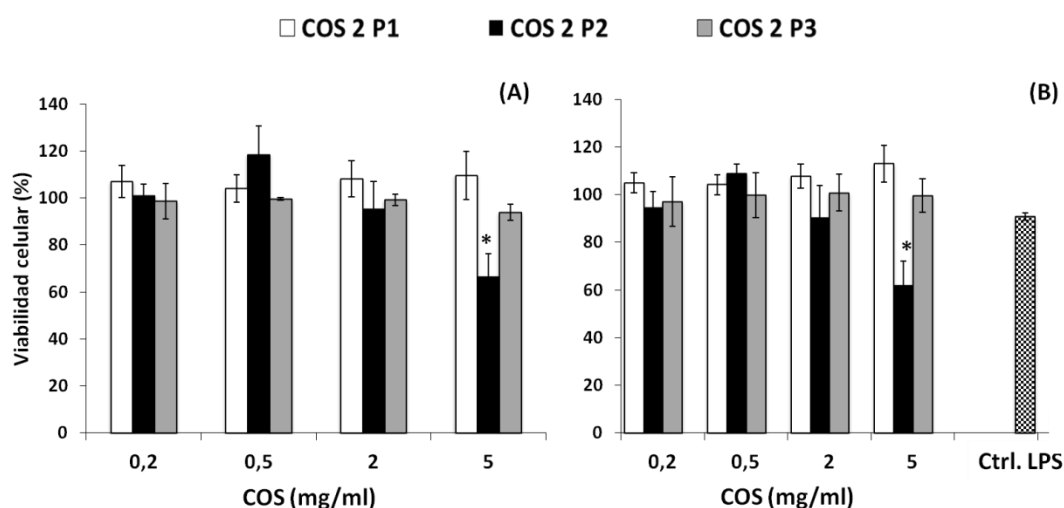


Figura IV.21. Efecto de los COS en la viabilidad de macrófagos Raw a diferentes concentraciones durante 4 h. (A) En ausencia de LPS. (B) En presencia de LPS (0,3 µg/ml). Las gráficas muestran la media de los experimentos (n=3) ± el error típico y el nivel de significación (p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 ***). La significación se expresa respecto al 100 % de viabilidad celular (control sin tratamiento).

Macrófagos Raw fueron incubados a en un rango de concentraciones de COS2 P1, COS2 P2 y CO2 P3 entre 0,2 y 5 mg/ml, en presencia y ausencia de LPS (0,3 µg/ml) durante 4 horas, determinándose posteriormente la viabilidad celular. Como se muestra en la Fig. IV.21A y B tan

solo se observó una disminución significativa de la viabilidad celular ($p < 0,05$) mediada por el COS 2 P2 cuando se utilizó a 5 mg/ml tanto en presencia como en ausencia de LPS. Por esta razón se seleccionó la concentración de 2 mg/ml para determinar la acción antiinflamatoria de los COS *in vitro*, dado que fue la mayor concentración ensayada que no produjo efectos citotóxicos

3.4.2.2. Efecto de los COS en vías de señalización intracelular activadas por LPS

Macrófagos Raw se estimularon con LPS (0,3 $\mu\text{g/ml}$) y/o COS (2 mg/ml) durante 30 minutos. A continuación, mediante Western Blot, se determinó el estado de activación de vías de señalización intracelulares implicadas en la respuesta inflamatoria provocada por LPS. Para ello, se analizaron los niveles de fosforilación de tres proteínas MAPK (ERK1/2, JNK1/2 y p38 α) responsables de transducir la señal activadora del LPS (Johnson *et al.*, 2002). También se determinó el nivel de degradación del factor IKB α , el cual se encuentra formando un complejo citoplasmático con el factor de transcripción NF- κ B, del que se disociará y posteriormente pasará a ser degradado como consecuencia de la señal activadora del LPS, permitiendo la entrada de NF- κ B en el núcleo celular (Hayden *et al.*, 2006). Cada proteína forma parte de una vía de transducción de señales intracelulares activadas por LPS, las cuales producirán cambios en la expresión génica de citoquinas proinflamatorias.

En concordancia con los datos descritos en la literatura (Bode *et al.*, 2012), se observó activación de ERK1/2, JNK1/2 y p38 α , así como degradación del factor IKB α tras la estimulación de los macrófagos con LPS (Fig. IV.22A). Al igual que en el modelo *in vivo*, el nivel de activación de estas vías tras la estimulación con LPS, se consideró el máximo conseguido en estas células, respecto a una señal pro-inflamatoria, en las condiciones experimentales ensayadas.

En la Figura IV.22B se muestra el efecto de los distintos COS sobre la activación de ERK1/2 en ausencia y en presencia de LPS. En ausencia de LPS, se observó un aumento significativo de P-ERK1/2 promovido por COS 2 P2 ($p < 0,01$). Dicho nivel de activación fue similar al producido por la presencia de LPS. Sin embargo, ni COS2 P1 ni COS 2P3 promueven un aumento significativo de la activación de esta vía en ausencia de LPS. En presencia de LPS se observó una disminución significativa de P-ERK1/2 con cualquiera de los tres COS ($p < 0,01$).

En la Figura IV.22C se muestra el efecto de los distintos COS sobre la activación de JNK1/2 en ausencia y en presencia de LPS. En ausencia de LPS, no se observó un aumento significativo de

P-JNK1/2 en presencia de ninguno de los COS. Por otra parte, en presencia de LPS se observó una disminución de P-JNK1/2 con cualquiera de los COS, la cual fue más significativa en presencia de COS 2 P1 y COS 2 P2 ($p < 0,01$), que en presencia de COS 2 P3 ($p < 0,05$).

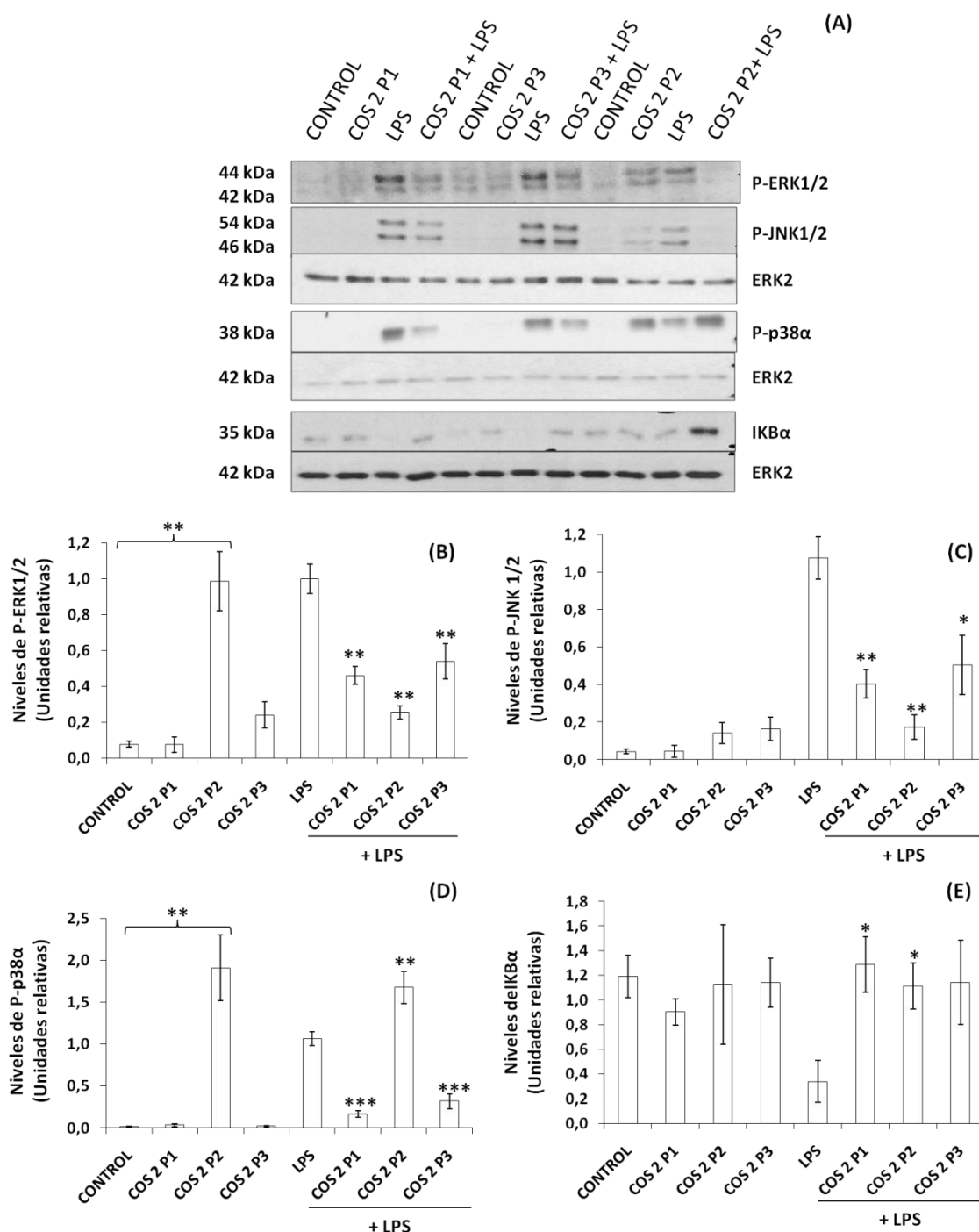


Figura IV.22. Niveles de fosforilación de ERK1/2, JNK1/2, p38α y factor IKBα en macrófagos Raw determinados mediante Western Blot tras la estimulación con LPS (0,3 μg/ml) y/o COS (2 mg/ml) en medio de cultivo en ausencia de FBS. (A) Imagen representativa de la cantidad de proteína detectada. Como control de carga se utilizó la proteína ERK2, cuyos niveles de expresión son constitutivos. (B) Niveles de activación de ERK1/2. (C) Niveles de activación de JNK1/2. (D) Niveles de activación de p38α.

(E) Niveles de activación de IKB α . (B-E) Las gráficas muestran la media de 3 experimentos independientes ($n=3$) \pm el error típico y el nivel de significación ($p<0,05$ *, $p<0,01$ **, $p<0,001$ ***).

En la Figura IV.22D se muestra el efecto de los distintos COS sobre la activación de p38 α en ausencia y en presencia de LPS. Se observó que COS 2 P2 promueve un significativo aumento ($p < 0,01$) de P-p38 α , el cual es superior al promovido por LPS. Los otros dos COS testados no produjeron activación de p38 α respecto al control al ensayarlos en ausencia de LPS, y promueven una disminución significativa en la activación de p38 α promovida por LPS ($p < 0,001$).

En la Figura IV.22E se muestra el efecto de los distintos COS sobre la degradación de IKB α en ausencia y en presencia de LPS. En ausencia de LPS, ninguno de los distintos COS fueron capaces disminuir los niveles de IKB α respecto al control. Sin embargo, los tres COS fueron capaces de frenar la degradación de IKB α inducida por LPS. En el caso de COS 2 P1 y COS 2 P2 este efecto fue significativo respecto al nivel de degradación de IKB α producido por LPS ($p < 0,05$).

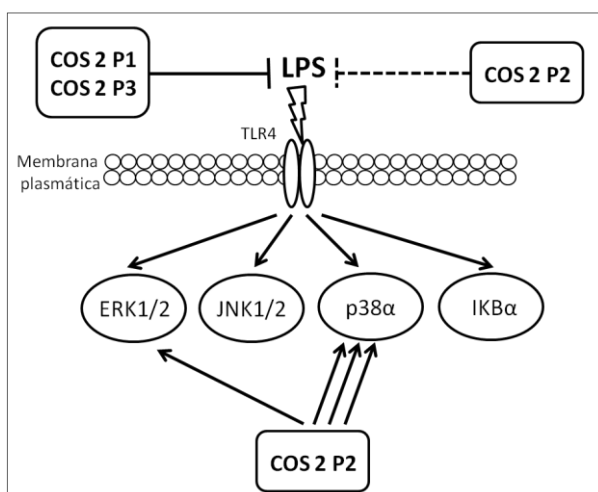


Figura IV.23. Esquema resumen del efecto de los COS ensayados sobre la activación de las MAPK y la degradación del factor IKB α en macrófagos Raw.

En definitiva, estos resultados mostraron que COS 2 P1 sería capaz de inhibir parcialmente la activación de ERK1/2, de JNK1/2 y de p38 α , así como la degradación de IKB α ocasionada por LPS. Este COS no produciría ningún efecto sobre las vías mencionadas por si solo. Por tanto, COS 2 P1 no es tóxico en las condiciones experimentales ensayadas, y podría inhibir, al menos parcialmente las vías pro-inflamatorias promovidas por LPS en Raw. En el caso de COS 2 P3 se observó un comportamiento similar respecto a su inocuidad y a su capacidad para inhibir parcialmente el efecto del LPS, aunque su efecto sobre P-JNK1/2 y sobre el factor IKB α fue menos eficaz respecto a COS 2 P1.

El COS 2 P2 presenta una acción diferente, ya que en ausencia de LPS promovió la activación de las MAPK ERK1/2 y p38 α , aunque no JNK1/2, y los niveles de activación observados fueron similares y superiores, respectivamente, a los promovidos por el control LPS, comportándose por tanto como una molécula con actividad pro-inflamatoria. Cuando se ensayó en presencia de LPS inhibió parcialmente la activación de ERK1/2 y JNK1/2, así como la degradación del factor IKB α , pero no la de p38 α (Fig. IV.23).

Vía de actuación de COS 2 P2 sobre la activación de ERK1/2 y p38 α .

Para investigar en más detalle los efectos de COS2 P2 sobre las vías de señalización descritas, se propuso estudiar cual podría ser el receptor de membrana utilizado por esta molécula. Para ello se utilizó el sulfato de polimixina B (en adelante polimixina), endotoxina que inhibe la acción de LPS, ya que forma un complejo con éste e impide que sea reconocido por su receptor de membrana TLR4 (Pristovsek *et al.*, 1999).

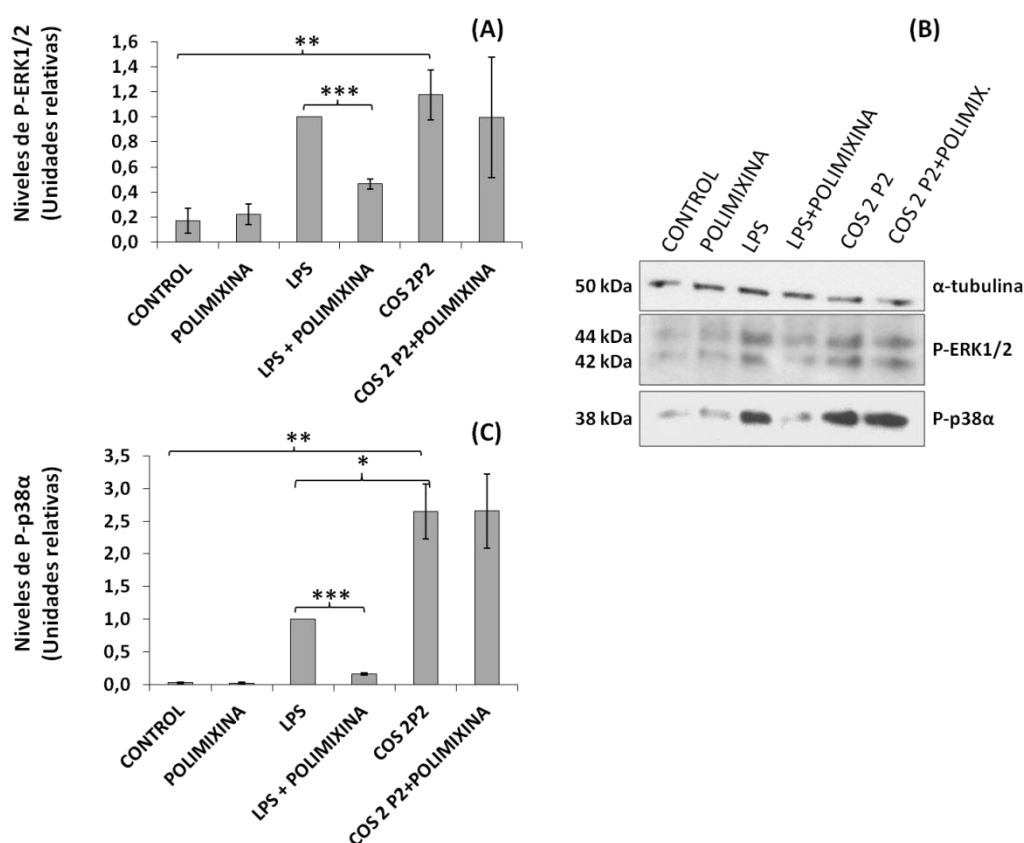


Figura IV.24. Efecto de COS 2 P2 en la activación de ERK1/2 y p38 α en presencia y ausencia de polimixina (1 μ g/ml). (A) Se muestran los niveles de activación de ERK1/2. (C) Se muestran los niveles de activación de p38 α . Las gráficas muestran la media de 3 experimentos independientes (n=3) \pm el error típico y el nivel de significación (p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 ***). (B) Imagen representativa de la cantidad de proteína detectada mediante Western Blot. Se utilizó α -tubulina como control de carga.

En la Figura IV.24 se muestra el efecto de COS 2 P2 sobre la activación de ERK1/2 y p38 α en ausencia o presencia de polimixina. Mientras que la polimixina inhibió significativamente la acción del LPS ($p < 0,001$) como era de esperar, no se detectó ningún efecto sobre la activación de ERK1/2 o p38 α promovidos por COS 2 P2. Por tanto, estos resultados permitieron establecer que la activación de las vías inflamatorias promovida por COS 2 P2 no estaríateniendo lugar a través de la misma vía de activación del LPS (TLR4), puesto que una vez inhibida la acción de este, el COS 2 P2 continuó produciendo activación de ERK1/2 y p38 α .

Puesto que los resultados mostrados indicaron que COS 2 P2 no parece actuar a través de la vía TLR4, se propuso investigar la posibilidad de que esta molécula necesitara ser internalizada para ejercer su función. Para explorar esta posibilidad se utilizó la droga citocalasina B (en adelante citocalasina), un inhibidor de la fagocitosis celular (Axline *et al.*, 1974), mecanismo a través del cual algunos patógenos son internalizados en vacuolas hacia el citoplasma celular que conlleva la activación de la respuesta inflamatoria (Ricevuti *et al.*, 1993).

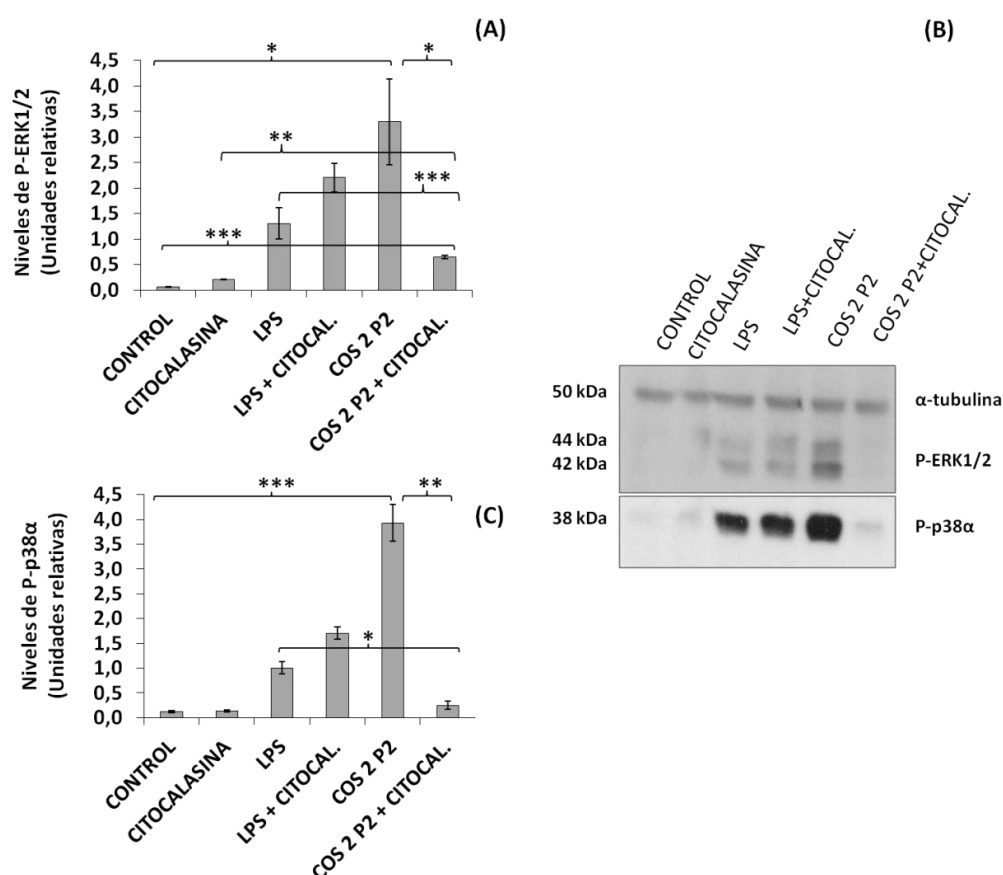


Figura IV.25. Efecto de COS 2 P2 en la activación de ERK1/2 y p38 α en presencia y ausencia de citocalasina (10 μ g/ml). (A) Se muestran los niveles de activación de ERK1/2. (C) Se muestran los niveles de activación de p38 α . Las gráficas muestran la media de 3 experimentos independientes ($n=3$) \pm el error típico y el nivel de significación ($p<0,05$ *, $p<0,01$ **, $p<0,001$ ***). (B) Imagen representativa de la cantidad de proteína detectada mediante Western Blot. Se utilizó α -tubulina como control de carga.

En la Figura IV.25 se muestra el efecto de COS 2 P2 sobre la activación de ERK1/2 y p38 α en presencia de citocalasina. El aumento significativo de la actividad de estas dos proteínas promovido por COS 2 P2 se redujo drásticamente cuando el cultivo celular se pre-incubó con citocalasina. Por tanto, estos resultados indicaron que la activación de ERK1/2 y p38 α promovida por COS 2 P2 requería fagocitosis, puesto que una vez inhibido este proceso celular con citocalasina, se inhibió la activación de estas MAPK. Habría que señalar que esta inhibición fue parcial, puesto que el nivel de P-ERK1/2 detectado en presencia de ambos compuestos ($0,65 \pm 0,03$) supuso un aumento significativo respecto al control sin tratamiento ($p < 0,001$) y también respecto al control de citocalasina ($p < 0,01$). Este hecho estaría indicando que parte de COS 2 P2 sigue ejerciendo activación de ERK1/2 por otra vía independiente de la fagocitosis (Fig. IV.12A).

3.4.2.3. Efecto de los COS sobre el estrés oxidativo generado por H₂O₂

La inflamación también está estrechamente relacionada con el estrés oxidativo (Van der Vliet *et al.*, 2014). Este tipo de estrés provoca el aumento de la concentración intracelular de ROS y ello conlleva la activación de la vía de las MAPK p38 y ERK, entre otras, induciendo la translocación del factor NF- κ B al núcleo celular, y con ello la activación de la respuesta inflamatoria (Dimozi *et al.*, 2015).

Macrófagos Raw se estimularon con H₂O₂ (500 μ M) para provocar un estrés oxidativo, y/o COS (2 mg/ml) durante 18 horas. Transcurrido este periodo, se determinó la intensidad de fluorescencia mediante citometría de flujo, indicador de la cantidad de ROS intracelular, y por ende, del daño oxidativo. También se determinó el nivel de viabilidad celular tras 18 horas de tratamiento, puesto que los tratamientos con H₂O₂ pueden llegar a ser citotóxicos (Rhee, 2006). En la Figura IV.26 se muestra el nivel de fluorescencia originado como consecuencia del estrés oxidativo, así como la viabilidad del tratamiento. Se observó un nivel de fluorescencia basal en el control, puesto que esta línea celular en estado desactivado presenta un nivel basal de ROS como consecuencia del complejo NADPH oxidasa (Bedard *et al.*, 2007). En ausencia de estrés oxidativo, no se observó ningún efecto sobre el nivel basal de fluorescencia en presencia de 2 mg/ml de cualquiera de los COS. Por tanto, se demostró que ningún COS generó estrés oxidativo en las condiciones experimentales ensayadas.

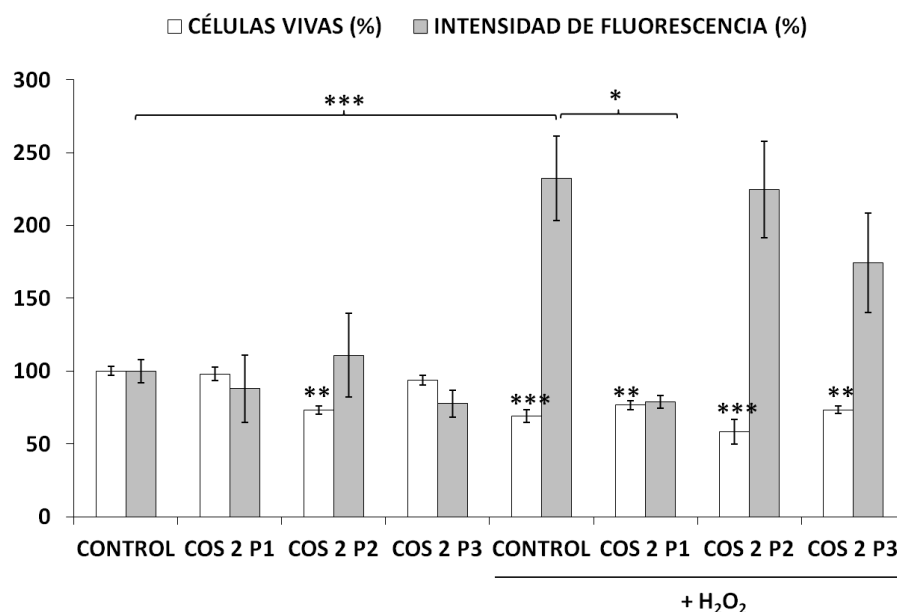


Figura IV.26. Efecto de los COS (2 mg/ml) sobre la generación de ROS en macrófagos Raw determinado mediante citometría de flujo. Se determinó la viabilidad celular tras la estimulación durante 18 horas con H₂O₂ (500 μ M) mediante citometría de flujo tras la incubación del extracto celular con ioduro de propidio. Se muestra la media de 3 experimentos independientes (n=3) \pm el error típico y el nivel de significación (p<0,05 *, p<0,01 **, p<0,001 ***).

Se comprobó que el tratamiento con H₂O₂ (500 μ M) afectó de manera significativa a la viabilidad celular (p < 0,001) en las condiciones experimentales ensayadas, obteniéndose un 69 \pm 4 % de viabilidad. En ausencia de H₂O₂, la presencia de COS 2 P2 (2 mg/ml) también afectó negativamente a la viabilidad celular (p < 0,01), hecho que no se observó con los otros COS. Por otro lado, en presencia de H₂O₂ y de cualquiera de los COS, la viabilidad celular disminuyó (p < 0,001), siendo el COS 2 P2 el que promovió mayor descenso (58 \pm 8 %). En presencia de COS 2 P1 o COS 2 P3 y estrés oxidativo, la disminución de la viabilidad se vio amortiguada ya que fue menos significativa que en presencia de H₂O₂ (p < 0,01), obteniéndose un 77 \pm 3 % y 73 \pm 3 % respectivamente. Por tanto, la presencia de COS 2 P1 y COS 2 P3 protegieron del estrés oxidativo generado por la presencia de H₂O₂, hecho que no se observó en presencia de COS 2 P2. Además el de COS 2 P2 (2 mg/ml) en ausencia de H₂O₂, afectó negativamente a la viabilidad celular, poniendo de manifiesto la citotoxicidad de este COS en macrófagos Raw en ensayos más prolongados en el tiempo.

La adición de H₂O₂ (500 μ M) al medio de cultivo incrementó significativamente (p < 0,001) el nivel de fluorescencia basal, lo cual indicó un aumento del nivel de ROS y por tanto de estrés oxidativo (Fig. IV.26). En presencia de COS 2 P1 y H₂O₂ se observó una disminución significativa (p < 0,05) del nivel de fluorescencia. Asimismo, el COS 2 P3 también produjo una disminución

de la fluorescencia, pero esta no fue significativa. En cambio, la presencia de COS 2 P2 en el medio con H₂O₂ no alteró el nivel de fluorescencia. Estos resultados demostraron que COS 2 P1 fue el único COS con capacidad para disminuir significativamente el nivel de ROS generado como consecuencia del estrés oxidativo provocado por H₂O₂ en las condiciones experimentales ensayadas.

3.4.3. Estudio de la distribución de grados de polimerización y de la composición intramolecular de los COS 2

En la Tabla IV.12 se presentan los parámetros fisicoquímicos que previamente se habían determinado para las tres muestras de COS seleccionadas para el estudio de actividad antiinflamatoria. En general, la distribución de M_w que presentaron los COS 2 fue unimodal y poco polidispersa, como indicó el PDI cercano a uno (Tabla IV.4). El DA varió entre 11 % y 47 %, y todos estos COS presentaron un PA dominante aleatorio.

Tabla IV.12. Parámetros fisicoquímicos de las muestras empleadas para el estudio de la actividad antiinflamatoria. (1) Determinado mediante HP-SEC. (2) Determinado mediante ¹H-RMN. (3) Determinado mediante ¹³C-RMN.

QsA	\bar{M}_w (kDa) ¹	PDI	DA (%) ²	PA ³
COS 2 P1	8,64	1,24	13	0,8
COS 2 P2	5,02	1,20	11	0,9
COS 2 P3	8,63	1,07	47	1,1

Puesto que se había observado un comportamiento diferente, tanto *in vivo* como *in vitro*, de las muestras de COS 2 en función de su proceso de obtención, en este apartado se profundiza en la caracterización de los COS 2 con el propósito de hallar diferencias estructurales con las que pudieran relacionarse. Para ello, este objetivo se abordó desde dos puntos de vista. En primer lugar, mediante cromatografía HP-SEC/UPLC-ESI-IT-MS se determinó la distribución de DP de las muestras. El segundo abordaje experimental fue directamente a través de MALDI-TOF-MS, para determinar la composición intramolecular y la abundancia de oligómeros completamente desacetilados. Actualmente esta metodología es ampliamente utilizada para analizar carbohidratos (Yang *et al.*, 2010), permite estudiar la composición intramolecular de polímeros de quitosano llegando a detectar moléculas con DP superiores a 18 (Wu *et al.*, 2008) y hasta DP de 24 (Mengibar *et al.*, 2011).

Distribución de grados de polimerización

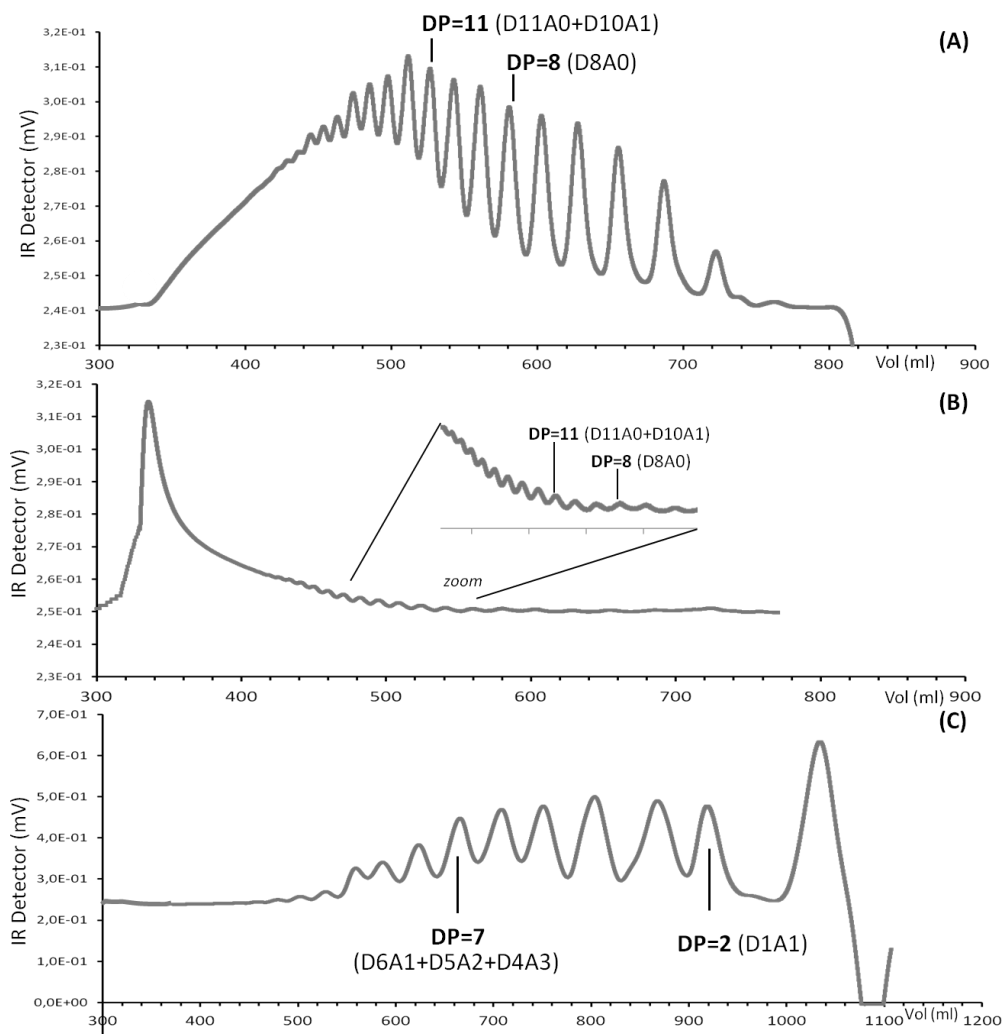


Figura IV.27. Perfiles cromatográficos de los COS 2 (M_w 10-5 kDa) obtenidos mediante los tres procesos a partir de QsA. (A) COS 2 P1; (B) COS 2 P2; (C) COS 2 P3. Se indican los picos analizados por HPLC-ESI-MS y entre paréntesis la composición intramolecular de estos. D hace referencia a unidades de N-glucosamina y A a unidades N-acetilglucosamina.

Se obtuvo una distribución de DP diferente para cada muestra, lo cual demostró que cada una estaba constituida por una mezcla de oligómeros heterogénea en DP y abundancia de estos (Fig. IV.27). Tras analizar algunos de los picos mediante HPLC-ESI-MS, se determinó su DP mayoritario y su composición intramolecular. La asignación se hizo en función de su relación m/z respecto a las masas calculadas teóricamente (véase Anexo II). La Figura IV.27A muestra la distribución de DP obtenida para COS 2 P1. Los espectros de masas indicaron que mayoritariamente, dichos oligómeros estaban completamente desacetilados (A0) o mono-acetilados (A1), lo que coincide con el perfil típico de los productos de hidrólisis de quitosanasas, como ya se había descrito para las fracciones homólogas de COS 3 P1. La

distribución de DP de este COS 2 P1 fue desde 3 hasta DP superiores a 18. En el caso de COS 2 P2 se observó una distribución de DP diferente de la anterior (Fig. IV.27B). Se detectó un pico de mayor intensidad, que eluía a menor tiempo de retención, indicando el mayor volumen hidrodinámico de sus moléculas. Asimismo, en los espectros de masas se detectó una distribución de DP entre 3 y 18, compuestos por oligómeros A0 y A1, como en caso anterior. En el análisis del COS 2 P3 se detectó un perfil cromatográfico diferente de los anteriores (Fig. IV.27C). Su distribución de DP presentó una mayor homogeneidad en cuanto a similar intensidad de los diferentes DP, y los valores estuvieron comprendidos entre DP 2 y 10, con una composición intramolecular constituida por distintas combinaciones di- y tri-acetiladas. En definitiva, se demostró que cada COS 2 estaba constituido por una composición y distribución de DP diferente.

Análisis de la composición intramolecular

Tras haber analizado cada muestra por MALDI-TOF-MS se pudo concretar la composición intramolecular y la abundancia de oligómeros A0. De nuevo, la asignación se hizo en función de su relación m/z respecto a las masas calculadas teóricamente (véase Anexo II), y los resultados se resumen en la Tabla IV.13.

Tabla IV.13. Abundancia total (%) de oligómeros con distinto número de acetilaciones y rango de DP que se detectó mediante MALDI-TOF-MS.

QsA	Rango DP	Nº monómeros acetilados									
		A0	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9 - A13
COS 2 P1	3 -24	42	54	3	1	0	0	0	0	0	0
COS 2 P2	3-17	50	27	14	9	0	0	0	0	0	0
COS 2 P3	3-25	0	13	17	11	9	14	10	10	6	10

En general, en todas las muestras se detectó una distribución de DP entre 3 y 25. Teniendo en cuenta esta información, el \overline{M}_w (Tabla IV.11) y el perfil cromatográfico anterior (Fig. IV.27), no parece que exista una correspondencia entre los resultados de \overline{M}_w obtenidos por HP-SEC y la distribución de DP obtenida tanto en el análisis anterior de HP-SEC/UPPLC-ESI-IT-MS, como mediante MALDI-TOF-MS, a través de los cuales no se pudieron detectar moléculas con DP superior a 25. Habría que tener presente, que el resultado del \overline{M}_w es un valor promedio del volumen hidrodinámico de la distribución moléculas que componen la fracción heterogénea

como las obtenidas en este trabajo de investigación. Aun así, todo parece indicar que podrían existir algunas cadenas de mayor DP que no se estuvieran detectando mediante MALDI-TOF-MS, pero incluso así estaríamos observando una parte mayoritaria y representativa de la muestra.

Respecto a la composición intramolecular que se obtuvo (Tabla IV.13), se comprobó que tanto en COS 2 P1 como en COS 2 P2 predominaban los oligómeros A0 y los mono-acetilados (A1). Este resultado concuerda con los resultados obtenidos a partir de HP-SEC/HPLC-ESI-MS, y completa la información de su composición, puesto que además se observó la presencia de moléculas con más de una acetilación, hecho que no se había observado mediante el primer análisis en el caso de COS 2 P1 y COS 2 P2. Al comparar estas dos muestras entre sí, se observó la mayor abundancia de oligómeros A0 en COS 2 P2 (A0 50%) respecto al COS 2 P1 (A0 42 %; A1 54%), en el que se observó su balance con las secuencias mono-acetiladas. Este resultado coincide con la tendencia observada en la composición de otros COS homólogos de estos procesos, tanto COS 1 (Tabla IV.7) como COS 3 (Tabla IV.5), como se comentaba anteriormente. Por otro lado, en la composición del COS 2 P3 se observó la ausencia de oligómeros A0, así como la presencia de moléculas acetiladas (con hasta 13 acetilaciones). En este último caso, la ausencia de oligómeros A0 coincide con la composición obtenida para el COS 3 P3 homólogo a este proceso (Tabla IV.5). En este sentido, parece que la tendencia en cuanto a composición y abundancia de oligómeros A0 y oligómeros acetilados, es extrapolable en todas las fracciones de diferente M_w dentro de un mismo proceso.

Con todo ello se comprobó que la tendencia en cuanto a abundancia de oligómeros A0 se mantenía en cada proceso para todos los COS obtenidos en cada uno de ellos, observándose la predominancia de oligómeros A0 respecto al resto de oligómeros acetilados en el caso de los COS obtenidos mediante P2, un balance entre tipo de moléculas desacetiladas y acetiladas en los COS obtenidos mediante P1, y la predominancia de oligómeros acetilados en los COS obtenidos mediante P3.

3.4.4. Relación entre la actividad antiinflamatoria de COS 2 y sus características fisicoquímicas

La caracterización fisicoquímica llevada a cabo permitió establecer relaciones entre la composición de los COS y el efecto que produjeron tanto *in vivo*, en un modelo de inflamación, como *in vitro*, en la regulación de vías intracelulares implicadas en la inflamación.

En las condiciones experimentales ensayadas, el COS 2 P1 inhibió parcialmente la respuesta inflamatoria producida por LPS *in vivo* e *in vitro*, así como el estrés oxidativo generado por la presencia de H₂O₂ en células aisladas. Además por sí solo no resultó citotóxico en macrófagos Raw en ninguna de las condiciones experimentales ensayadas. Aunque en ratones produjo migración de neutrófilos hacia la cavidad peritoneal, esta fue un 70 % inferior a la producida por LPS. Por otro lado, el COS 2 P3 se comportó de manera similar al COS 2 P1. Por un lado tampoco resultó citotóxico, aunque su efecto antiinflamatorio resultó ser menos eficaz, tanto en la inhibición de la respuesta inflamatoria, como en la inhibición del estrés oxidativo. Sin embargo cabe destacar que en ratones produjo una migración de neutrófilos similar a la que produjo el LPS. En cambio, el COS 2 P2 produjo un efecto diferente claramente inflamatorio, tanto *in vitro* como *in vivo*, y por este motivo se dedicará más adelante un apartado para explicar su comportamiento.

De los COS estudiados en este apartado, el COS 2 P1 (\overline{M}_w 8,64 kDa, PA aleatorio y A1 54%; A0 42 %) y por tanto, la obtención de COS mediante P1 es la opción más favorable para obtener COS inocuos y con capacidades antiinflamatorias. El COS 2 P3 (DA 47 % \overline{M}_w 8,63 kDa y PA aleatorio) con su predominancia de oligómeros acetilados y la ausencia de oligómeros A0, indujo una respuesta inflamatoria en ratones. Puesto que estas dos muestras presentaron un tamaño molecular similar (8,6 kDa), la diferencia de DA entre ambas, y por tanto, la diferente abundancia en la composición intramolecular, indicó que la abundancia de oligómeros acetilados (hasta A13) y la ausencia de oligómeros A0 no favoreció el efecto antiinflamatorio, al contrario de lo observado para COS 2 P1, con un equilibrio entre los oligómeros desacetilados y mono-acetilados. Referente a este parámetro, algunos estudios han informado sobre los efectos protectores de COS frente a la respuesta inflamatoria tanto *in vivo* como *in vitro*, cuyos DA eran inferiores a 20 % sin especificar la composición intramolecular, que claramente tiene una influencia (Yoon *et al.*, 2007; Fernandes *et al.*, 2010; Qiao *et al.*, 2011).

Respecto a la capacidad de estas muestras para inhibir el estrés oxidativo, de nuevo el COS 2 P1 fue capaz de inhibir el nivel de ROS intracelular generado por H₂O₂, amortiguando significativamente su efecto. Sin embargo, el COS 2 P3 mostró una tendencia a disminuir el nivel de ROS, aunque su efecto fue muy tenue. Como se comentó en el apartado de propiedades antioxidantes, la explicación más extendida sobre cómo los COS ejercen efecto protector frente a al estrés oxidativo, conlleva la implicación de los grupos hidroxilo y de los grupos amino libre del anillo de piranosa (Zou *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2005). Al margen de la participación de los grupos OH, los grupos amino libre entre los que si se observan diferencias,

se encuentran protonados en el medio de cultivo celular, y según esta explicación, el COS 2 P3 dispondría de menor abundancia de grupos amino libres disponibles para reaccionar con los ROS, respecto a los grupos de los que dispondría COS 2 P1. Este hecho explicaría el menor efecto protector frente al estrés oxidativo obtenido para COS 2 P3.

Puesto que a nivel molecular no se observó activación de ninguna de las vías de las MAPK estudiadas, ni activación de la vía de NF- κ B, ni generación de estrés oxidativo, no se logró establecer una relación directa sobre el mecanismo molecular que pudiera dar lugar al reclutamiento de neutrófilos a la cavidad peritoneal en ratones en ausencia de LPS por parte de COS 2 P3, y de manera más tenue por parte de COS 2 P1. Por otro lado, una posible hipótesis que explicaría el comportamiento observado de estos COS en presencia de LPS *in vivo* sería la interacción del LPS con el COS. Esta explicación implicaría el secuestro del LPS por parte de los COS, impidiendo que el LPS active la vía del TLR4, y con ello ejerciendo un efecto protector parcial en ratones. Esta interacción LPS-COS implicaría la formación de un complejo hidrosoluble entre la molécula de LPS y la de COS, a través de interacciones electroestáticas entre los grupos catiónicos de los COS y los grupos carboxilos y fosfatos presentes en la región del lípido A del LPS. Ello explicaría la mayor capacidad del COS 2 P1 para inhibir el reclutamiento de neutrófilos hacia la cavidad peritoneal respecto al COS 2 P3, ya que como se explicaba para la capacidad de inhibir estrés oxidativo, este COS presentaría mayor abundancia de grupos amino disponibles para secuestrar al LPS, debido a su DA (A0 42 %) respecto a menor cantidad de grupos amino disponibles que presentó el COS 2 P3 (DA 47 %; A0 0%). Asimismo, su composición intramolecular apoyaría esta hipótesis, puesto que en COS 2 P3 destacó la ausencia de cadenas completamente desacetiladas respecto a COS 2 P1 (Tabla IV.13).

Existen estudios que apoyarían esta hipótesis, puesto que se ha comprobado la interacción entre LPS y moléculas de quitosano de mayor M_w (20 kDa) que las empleadas en este estudio (Davydova *et al.*, 2000). También se ha comprobado que la formación del complejo LPS-quitosano dependerá tanto de la estructura del LPS, la cual a su vez depende de la especie bacteriana, como de los parámetros del microambiente donde se produzca la interacción y del ratio existente entre el LPS y las moléculas de quitosano (Davydova *et al.*, 2006). En este contexto, se demostró que los complejos LPS-quitosano eran menos tóxicos que el LPS solo (Yermak *et al.*, 2006).

Posteriormente, Naberezhnykh *et al.*, (2008) describieron que la formación del complejo LPS-quitosano se producía debido a interacciones electroestáticas entre ambas moléculas, sin embargo sugirieron la participación de otro tipo de fuerzas implicadas en la formación del complejo. Estas hacían referencia a puentes de hidrógeno, los cuales tendrían como donador de protones a los grupos hidroxilo del quitosano, así como a fuerzas hidrofóbicas implicadas en la estabilización del complejo en las que participarían los grupos acetilo del quitosano.

El DA del polímero es un factor clave en esta interacción, ya que conforme el polímero está más acetilado, dominaran las fuerzas hidrofóbicas (Schatz *et al.*, 2003a), lo cual conllevaría a la desestabilización del complejo LPS-COS (Naberezhnykh *et al.*, 2008). En un quitosano con más del 15 % de acetilación, las interacciones hidrofóbicas desestabilizarían la densidad de carga de la molécula y con ello, la flexibilidad de las cadenas de quitosano empezaría a disminuir (Anthonsen *et al.*, 1993). Este hecho conllevaría la desestabilización del complejo, puesto que en un complejo polisacárido y proteína, como es el caso, la densidad de carga lineal y la flexibilidad de las cadenas del polielectrolito influyen en el tamaño y la localización de la interacción, en definitiva, en los sitios de unión (Kayitmazer *et al.*, 2003).

Según lo expuesto, el COS 2 P1 tendría mayor posibilidad de formar un complejo hidrosoluble estable con el LPS empleado en este estudio. Por otro lado, la existencia de un 42 % de moléculas completamente desacetiladas halladas en COS 2 P1 (Tabla IV.13), frente a su ausencia en COS 2 P3 estaría favoreciendo un equilibrio entre las fuerzas que forman el complejo LPS-COS. Además la mayor abundancia de moléculas con hasta 13 acetilaciones en COS 2 P3 podría contribuir a la desestabilización del complejo LPS-COS debido a la mayor presencia de fuerzas de repulsión provocadas por los grupos acetilados.

Puesto que los trabajos acerca de la interacción LPS y quitosano son estudios aislados, y no están hechos en modelos *in vivo*, es necesario tener en cuenta el microambiente biológico en el cual se podría estar dando esta interacción, así como la posible participación de otras interacciones con biomoléculas u otras células del sistema inmune del organismo. Teniendo en cuenta la posibilidad de que parte del LPS sea acomplejado por el COS inhibiendo así su efecto, la detección de neutrófilos en ratones en presencia únicamente de COS, puso de manifiesto la implicación de otras dianas moleculares distintas a las estudiadas en este trabajo. Por ello, se hace necesario continuar investigando posibles dianas moleculares para los COS.

3.4.5. Relación entre la actividad proinflamatoria de COS 2 y sus características fisicoquímicas

El COS 2 P2 fue capaz de inducir la activación de la respuesta inflamatoria, independientemente de que inhibiera parcialmente el efecto producido por LPS. Este COS no protegió frente al estrés oxidativo generado por H₂O₂ y resultó citotóxico a 2 mg/ml afectando negativamente a la viabilidad celular tras 18 horas de incubación. En ratones, generó un reclutamiento de neutrófilos hacia la cavidad peritoneal que supuso más del doble del efecto producido por LPS. Por todo ello se estableció un comportamiento proinflamatorio para este COS 2 P2.

La activación de la vía de ERK1/2 conlleva una amplia respuesta celular ya que esta MAPK está implicada en casi todas las funciones celulares. Su fosforilación, y por ende su activación, se produce como consecuencia de diferentes tipos de señales extracelulares desencadenando distintos tipos de respuesta celular, como por ejemplo proliferación, autofagia o apoptosis (Cagnol *et al.*, 2010; Khavari *et al.* 2007; Mebratu *et al.*, 2009). La activación de ERK1/2 por COS 2 P2 tuvo lugar por una vía independiente a la vía del TLR4 y requirió la fagocitosis del oligosacárido. Sin embargo, esta activación no sucedió exclusivamente por fagocitos. En este contexto está descrito que existen números receptores intracelulares que reconocen distintos tipos moléculas y sería de gran interés estudiar si COS 2 P2 es capaz de activar alguno de ellos.

Respecto a la activación de la vía de p38 α , esta quedó inhibida casi en su totalidad en presencia de citocalasina, detectándose un nivel residual de $0,25 \pm 0,08$ de P-p38 α , el cual no fue significativo respecto al control negativo. Este hecho indicaría que su activación estaría sucediendo (casi en su totalidad) a través de familias de receptores implicados en la fagocitosis. Por otro lado, la vía de p38 α también puede activarse por estrés a través de otras vías independientes a la vía ERK1/2 (Sabio *et al.*, 2014).

Por otra parte, el estrés oxidativo es capaz de activar la vía de transducción del factor NF- κ B, que como ya se comentaba anteriormente, es una de las principales vías que se activan frente en la respuesta inmune e inflamatoria (Chen *et al.*, 1999). Esta vía de transducción de la señal se ha estudiado en este trabajo de manera indirecta a través de la degradación del factor I κ B α , el cual se encuentra formando un complejo citoplasmático con el factor NF- κ B que se disociará como consecuencia de la respuesta inflamatoria. Este hecho conlleva la degradación del factor I κ B α , la cual no se observó en presencia de COS 2 P2 ni de los otros COS en los tiempos examinados.

En relación a las características fisicoquímicas de este COS procedente de un proceso basado en una doble hidrólisis, también se observaron resultados que diferían respecto a los COS de los otros procesos. En primer lugar, su perfil cromatográfico mostró una distribución de DP diferente a los otros COS 2 (Fig. IV. 27B), observándose una distribución menos homogénea. Además, se comprobó la predominancia de oligómeros A0 (50 %) respecto a oligómeros acetilados, en comparación con las otras muestras (Tabla IV.13), peculiaridad que se venía observando para los COS del P2. Teniendo en cuenta el efecto antiinflamatorio descrito para COS con un M_w entre 5 y 10 kDa (Lee *et al.*, 2009; Yousef *et al.*, 2012; Bahar *et al.*, 2012) e incluso para COS con una distribución de DP inferiores a 10-13 (Qiao *et al.*, 2011; Fernandes *et al.*, 2010), se podría pensar que la menor homogeneidad de la distribución de DP y la predominancia de oligómeros A0 podrían estar contribuyendo al comportamiento proinflamatorio descrito para este COS 2 P2.

En segundo lugar, la mayor abundancia de extremos reductores ocupados por unidades D respecto a COS 2 P1 y P3, junto con la menor abundancia de oligómeros acetilados cuya presencia sería necesaria hasta un cierto nivel para establecer fuerzas hidrofóbicas implicadas en la estabilización del complejo con LPS, como se había comentado anteriormente, podría estar favoreciendo una conformación espacial en la que no tuviera lugar este efecto, favoreciendo la activación de la respuesta inflamatoria a través de alguno de sus múltiples sensores.

Respecto a la presencia de HMF detectada en COS 2 P2, intermediario común producido a partir de la Reacción de Maillard que sucede en ciertos alimentos debido al calor (Capuano *et al.*, 2011), existen estudios de administración oral de este compuesto en ratas y ratones durante periodos prolongados (hasta 2 años) en los cuales no se encontraron evidencias de toxicidad (NTP, del inglés National Toxicology Program, 2010). Por otro lado, la escasa intensidad de fluorescencia observada para esta muestra cuando se detectaron los AGEs, no parece indicar una presencia abundante de estos (Fig. IV.6). Sin embargo, los AGEs también se generan como consecuencia de la degradación de carbohidratos y proteínas, entre otras, producida por el envejecimiento celular, encontrándose estrechamente relacionados con enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas (Simm, 2013), a pesar de atribuírseles en contraposición actividad antioxidante también como se comprobó en el apartado 3.2 de este capítulo (Jung *et al.*, 2014). Los macrófagos presentan receptores para los AGEs (RAGEs) (Schmidt *et al.*, 1992; Basta, 2008) a través de cuales se activa, entre otras, la vía de ERK1/2 (Ott *et al.*, 2014). Aunque la activación de estos receptores no se estudió en este trabajo, la

presencia de estos productos podría estar contribuyendo al comportamiento proinflamatorio de este COS 2 P2.

Finalmente, en presencia de COS 2 P2 y LPS, se podría estar produciendo una interacción entre estas moléculas y formándose un complejo de la misma manera que ha comentado en el apartado anterior para la muestra de COS 2 P1, y como consecuencia de ello, se estaría produciendo la amortiguación parcial de la respuesta inflamatoria, como se ha observado para la vía de JNK1/2, de ERK1/2, o de IKB α (Fig. IV.22). Así por una parte acomplejaría al LPS, amortiguando su acción, y por otro lado, por otros receptores independientes de TLR4, activaría principalmente la vía de p38 α de manera más potente que lo hacía el LPS. Igualmente estaría sucediendo *in vivo*, puesto que COS 2 P2 promovió la migración de neutrófilos hacia la cavidad peritoneal con la misma intensidad que el LPS, y de manera más potente en ausencia de LPS.

En definitiva, el conjunto de características observadas en COS 2 P2 produjeron que esta muestra activara la respuesta inflamatoria *in vitro* e *in vivo*.

Conclusiones parciales

- El COS 2 P1 (M_w 8,6 kDa, DA 13 %) con un 42 % de oligómeros A0 y 54 % de A1, mostró capacidad para inhibir parcialmente la respuesta inflamatoria producida por LPS en macrófagos Raw. Inhibió de manera significativa el estrés oxidativo generado por peróxido de hidrógeno en esta línea celular y no mostró citotoxicidad en las condiciones experimentales ensayadas. Fue capaz de inhibir parcialmente la migración de neutrófilos producida por LPS hacia la cavidad peritoneal en ratones. Por sí solo produjo una activación de neutrófilos un 70 % inferior a la producida por LPS.
- El COS 2 P3 (M_w 8,6 kDa, DA 47 %) con ausencia oligómeros A0, mostró un comportamiento similar al COS 2 P1 en macrófagos Raw, respecto a la inhibición parcial de las vías MAPK y NF- κ B. En ratones produjo una migración de neutrófilos similar a la producida por LPS.
- El COS 2 P2 (M_w 5,0 kDa, DA 11 %) con un 50 % de oligómeros A0, 27% de A1 y presencia de compuestos de reacción de Maillard, mostró capacidad para activar la vía de ERK1/2 y de p38 α , y para ello necesitó ser fagocitado, demostrándose su no implicación con la vía del TLR4. En ratones produjo un reclutamiento de neutrófilos superior al que produjo el LPS.

V. CONCLUSIONES

1. Los tres procesos de obtención de COS permitieron obtener 18 fracciones de rango de M_w (10-30, 5-10 y <5Da) y composición diferente, a partir de dos quitosanos iniciales similares en cuanto a DA, PA y \overline{M}_w . Se demostró la actuación efectiva de la quitosanasa EC.1.2.3.132 de *Streptomyces griseus* sobre quitosanos parcialmente acetilados (DA 17 - 43 %) con un \overline{M}_w entre 22 kDa y 114 kDa, produciéndose un aumento de los extremos reductores ocupados por unidades de N-glucosaminas (D) respecto a los quitosanos originales. El PA de los COS no se vio afectado en ninguno de los procesos y todos los COS mostraron un PA aleatorio. Todos los COS procedentes de QsB fueron de menor \overline{M}_w y mayor abundancia de DP menores que los COS procedentes de QsA.
2. La doble hidrólisis del P2 que consistió en una hidrólisis ácida previa a la despolimerización enzimática, provocó que se generaran COS de menor \overline{M}_w respecto a los COS de los P1 y P3, y con una composición diferente debido a la mayor abundancia de extremos reductores ocupados por unidades D, y la presencia de HMF y AGEs. Los COS <5 kDa presentaron mayor abundancia de oligómeros completamente desacetilados, respecto a los COS <5 kDa del P1, y presentaron moléculas con hasta 5 acetilaciones en el caso de QsB.
3. Mediante el P3 que consistió en una reacción de reacetilación previa a la despolimerización enzimática, se obtuvieron COS <5 kDa con mayor abundancia de oligómeros acetilados (hasta 10 acetilaciones) respecto a los COS <5 kDa de los procesos P1 y P2, destacando un 30 % de oligómeros completamente desacetilados en COS <5 kDa procedente de QsB, respecto a su ausencia en COS <5 kDa de QsA.
4. La composición intramolecular de algunos COS de mayor M_w (COS 1 10-30 kDa y COS 2 5-10 kDa) fue similar a los COS 3 (<5 kDa) homólogos de sus respectivos procesos en cuanto a abundancia de oligómeros completamente desacetilados, corroborándose la tendencia en cuanto a composición intramolecular y pudiendo ser extrapolable a todas las fracciones dentro de un mismo proceso.
5. Los COS 1 y 2 procedentes del P1 y de QsB (\overline{M}_w 5,64 y 17,21 kDa, DA 11 y 14 % respectivamente) ejercen un mayor efecto antibacteriano para *E. coli* y *L. monocytogenes* respecto a los COS del P2, en cuya composición predominaron los oligómeros completamente desacetilados (A0). El balance entre oligómeros acetilados de mayor M_w y oligómeros A0 parece resultar necesario para que predominen las interacciones electrostáticas entre la superficie celular y el COS. Este mecanismo no excluiría la penetración de oligómeros de menor M_w al interior celular, puesto que se trata de mezclas heterogéneas de COS. El microorganismo gram negativo *E. coli* es más susceptible a la presencia de COS que el gram positivo *L. monocytogenes*.

6. Se desarrolla una mejor capacidad antioxidante en fracciones de COS < 5 kDa (COS 3, DP 4 - 15). La composición de oligómeros completamente desacetilados de los COS más activos en atrapamiento de radicales ABTS y DPPH varió entre 0 y 88 % demostrándose mayor participación de los grupos hidroxilo mediante donación de electrones en estos mecanismos.
7. Los COS 3 P2 fueron los más activos en cuanto a poder reductor FRAP y capacidad ORAC. Se demostró que en el poder reductor podría influir un alto porcentaje de extremos reductores ocupados por unidades D y la presencia de AGEs, mientras que en la capacidad ORAC además de los extremos reductores ocupados por unidades D y la presencia de AGEs, un alto porcentaje de grupos amino libre podrían estar influyendo en la capacidad donadora de átomos de hidrógeno.
8. Los COS (\overline{M}_w 5,02 - 18,28 kDa) procedentes de QsA mediante P1 y P2 con una predominancia de oligómeros A0 presentaron mejor mucoadhesión que COS con mayor abundancia de oligómeros acetilados (\overline{M}_w 8,63 y 18,86 kDa, DA ~ 46 %), demostrándose la menor influencia del peso molecular, y la mayor influencia de la composición intramolecular de oligómeros acetilados en esta capacidad.
9. El balance entre oligómeros acetilados (A1 54%) y desacetilados (A0 42 %) permitió que el COS 2 P1 de QsA (\overline{M}_w 8,6 kDa, DA 13 %) inhibiera parcialmente la respuesta inflamatoria promovida por LPS de manera más eficaz que el COS 2 P3 de QsA (\overline{M}_w 8,6 kDa, DA 47 %, A0 0%) tanto *in vivo* como *in vitro*. En cambio, la predominancia de oligómeros desacetilados (A0 50%; A1 27%), la mayor presencia de extremos reductores ocupados por unidades D, y la presencia de HMF y de AGEs, provocaron que el COS 2 P2 (\overline{M}_w 5,02 kDa, DA 11 %) fuera fagocitado, activando la respuesta inflamatoria celular, demostrándose su no implicación con la vía del TLR4.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abd-Elmohdy, F.A., El-Sayed, Z., Essam, S., Hebeish, A. (2010). Controlling chitosan molecular weight via bio-chitosan analysis. *Carbohydrate Polymers*, 3 (82), 539-542.
- Acosta, C., Jiménez, C., Borau, V., Heras, A. (1993) Extraction and characterization of chitin from crustaceans. *Biomass and Bioenergy*, 5(2), 145-53.
- Aiba, S. (1991). Studies on chitosan: 3. Evidence for the presence of random and block copolymer structures in partially N-acetylated chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 13 (1), 40-44.
- Aiba, S. (1992). Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14 (4), 225-228.
- Aiba, S. (1994). Preparation of IV-acetylchitoooligosaccharides by hydrolysis of chitosan with chitinase followed by IV-acetylation. *Carbohydrate research*, 265, 323-328.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124 (4), 783-801.
- Allan, C. R., Hadwiger, L. A. (1979). The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental Mycology*, 3(3), 285–287.
- Allan, G. G., Peyron, M. (1995a). Molecular weight manipulation of chitosan I: kinetics of depolymerization by nitrous acid. *Carbohydrate Research*, 277(2) 257–272.
- Allan, G. G., Peyron, M. (1995b). Molecular weight manipulation of chitosan II: prediction and control of extent of depolymerization by nitrous acid. *Carbohydrate Research*, 277(2), 273–282.
- Andres, A. C., Arthur, I.C. (2004). Antioxidant properties of S-adenosyl- L-methionine in Fe2C-initiated oxidations. *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 1303–1316.
- Anraku, M., Fujii, T., Kondo, Y., Kojima, E., Hata, T., Tabuchi, N., et al. (2011). Antioxidant properties of high molecular weight dietary chitosan in vitro and in vivo. *Carbohydrate Polymers*, 83, 501-505.
- Anthonsen, M.W., Vårum, K.V., Smidsrød, O. (1993). Solution properties of chitosans: conformation and chain stiffness of chitosans with different degrees of N-acetylation. *Carbohydrate Polymers*, 22, 193-201.
- Anthonsen, M.W., Smidsrød, O. (1995). Hydrogen ion titration of chitosans with varying degrees of N-acetylation by monitoring induced ¹H-NMR chemical shifts. *Carbohydrate Polymers*, 26, 303-305.
- Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G., Heras, A. (2009). Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*, 3, 203-230.

Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris R., Miralles, B., Acosta, N., Calderón, L., Sánchez, A., Heras, A. (2014) Role of Physicochemical Properties of Chitin and Chitosan on their Functionality. *Current Chemical Biology*, 8, 27-42

Argüelles, W. Heras, A., Acosta, N., Galed, G., Gallardo, A., Miralles, B. (2004). "Caracterización de quitina y quitosano" en "Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones". Pastor de Abram A. (editor) Programa CYTED, CIAD y Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima, Perú, 195–197.

ASTM F2103-01 (2007). Standard Guide for Characterization and Testing of Chitosan Salts as Starting Materials Intended for Use in Biomedical and Tissue-Engineered Medical Product Applications

Axline, S. G., Reaven, E. P. (1974). Inhibition of phagocytosis and plasma membrane mobility of the cultivated macrophage by cytochalasin B. Role of subplasmalemmal microfilaments. *Journal of Cell Biology*, 62 (3), 647-59.

Azuma, K., Osaki, T., Minami, S., Okamoto, Y. (2015). Anticancer and Anti-Inflammatory Properties of Chitin and Chitosan Oligosaccharides, *Marine Drugs*, 6, 33-49.

Bahar, B., O'Doherty, J. V., Maher, S., McMorrow, J., & Sweeney, T. (2012). Chitooligosaccharide elicits acute inflammatory cytokine response through AP-1 pathway in human intestinal epithelial-like (Caco-2) cells. *Molecular Immunology*, 51, 283-291.

Banerjee, A., Gerondakis, S. (2007). Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system. *Immunology and Cell Biology*, 85, 420-424.

Banoub, J.H., El Aneed, A., Cohen, A.M., Joly, N. (2010). Structural investigation of bacterial lipopolysaccharides by mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Mass Spectrometry Review*, 29(4), 606-650.

Basta G. (2008). Receptor for advanced glycation end products and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. *Atherosclerosis* (196) 9–21.

Bedard, K., Krause, K. H. (2007). The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews*, 87 (1), 245-313.

Benhabiles, M.S, Salah, R., Lounici, H., Drouiche, N., Goosen, M.F.A, Mameri, M. (2012) Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloids*, 29, 48-56.

Benzie, Iris F. Fy J.J. Strain. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, (1), 239, 70-76.

Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, 11 (0), 127-152.

Beutler, B. A. (2009). TLRs and innate immunity. *Blood*, 113, 1399-407.

- Bhat, A. H., Dar, K. B., Anees, S., Zargar, M. A., Masood, A., Sofi, M. A., et al. (2015). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases, a mechanistic insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 74, 101-110.
- Bode, J. G., Ehrling, C., & Häussinger, D. (2012). The macrophage response towards LPS and its control through the p38MAPK–STAT3 axis. *Cellular Signalling*, 24 (6), 1185-1194.
- Bone, R.D. (1996). The sepsis syndrome. Definition and general approach to management. *Clinics in chest medicine*, (2), 175-81.
- Boren, T., Falk, P., Roth, K. A., Larson, G., Normark, S. (1993). Attachment of *Helicobacter-Pylori* to Human Gastric Epithelium Mediated by Blood-Group Antigens. *Science*, 262, 1892-1895.
- Brugnerotto, J., Lizardi, J., Goycoolea, F.M., Argüelles-Monal, W., Desbrières, J., Rinaudo M. (2001a). An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, 42, 3559–80.
- Brugnerotto, J., Desbrières, J., Roberts, G., Rinaudo, M. (2001b). Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. *Polymer*, 42(25), 09921-09927.
- Cabrera, J.C. P., Cutsem, P. (2005). Preparation of chitooligosaccharides with degree of polymerization higher than 6 by acid or enzymatic degradation of chitosan. *Biochemical Engineering Journal*, 25 (2), 165-172.
- Calabrese, V., Lodi, R., Tonon, C., D’Agata, V., Sapienza, M., Scapagnini, G., Mangiameli, A., Pennisi, G., Giuffrida Stella, A. M., & Butterfield, D. A. (2005). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedreich’s ataxia. *Journal of the Neurological Sciences*, 233, 145–162.
- Cagnol, S., Chambard, J. C. (2010). ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS Journal*, 277(1), 2-21.
- Capuano, E., Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT–Food Science and Technology*, 44, (4) 793–810
- Cao, G. H., Prior, R. L. (1999). Measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. Oxidants and antioxidants. *Methods in Enzymology*, 299, 50-62.
- Chang, K. L. B., Tsai, G., Lee, J., & Fu, W. R. (1997). Heterogeneous N-deacetylation of chitin in alkaline solution. *Carbohydrate Research*, 303, 327–332.
- Chang, S., Lin, H. V., Wu, G., & Tsai, G. J. (2015). pH effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 134, 74-81.

- Chen, F., Castranova, V., Shi, X., Demers, L.M. (1999). New insights into the role of nuclear factor- κ B, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clinical Chemistry*, 45, 7–17.
- Chen, M., Zhu, X., Li, Z., Guo, X., Ling, P. (2010). Application of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) in preparation of chitosan oligosaccharides (COS) with degree of polymerization (DP) 5–12 containing well-distributed acetyl groups. *International Journal of Mass Spectrometry*, 290, 94–99.
- Chen, S.K., Tsai, M.L., Huang, J.R., Chen, R.H. (2009). In Vitro Antioxidant Activities of Low-Molecular-Weight Polysaccharides with Various Functional Groups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(2), 2699-2704.
- Chen, Y., Chung, Y., Wang, L., Chen, K., & Li, S. (2002). Antibacterial properties of chitosan in waterborne pathogen. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 37, 1379–1390.
- Chen, Z. J., Bhoj, V. and Seth, R. B. (2006). Ubiquitin, TAK1 and IKK: is there a connection? *Cell Death and Differentiation* 13 (5), 687-92.
- Chiang, C.L., Chang, C.T., Sung, H.Y. (2003). Purification and properties of chitosanase from a mutant of *Bacillus subtilis* IMR-NK1. *Enzyme and Microbial Technology*, 32 (2): 260- 267.
- Choi, B. K., Kim, K. Y., Yoo, Y. J., Oh, S. J., Choi, J. H., Kim, C. Y. (2001). In vitro antimicrobial activity of a chitoooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Streptococcus mutans*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18, 553–557.
- Chung, Y.C., Y.P. Su, C.C. Chen, G. Jia, H.L. Wang, J.C. Wu y J.G. Lin. (2004). Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacology Sinica*, 25(7), 932-936.
- Chung, Y. C., Kuo, C. L., & Chen, C. C. (2005). Preparation and important functional properties of water-soluble chitosan produced through Maillard reaction. *Bioresource Technology*, 96(13), 1473–1482.
- Chung, Y.C., Chen, C.Y. (2008) Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technology* 99, 2806–2814.
- Chung, M. J., Park, J. K., & Park, Y. I. (2012). Anti-inflammatory effects of low-molecular weight chitosan oligosaccharides in IgE–antigen complex-stimulated RBL-2H3 cells and asthma model mice. *International Immunopharmacology*, 12(2), 453-459.
- Colfen, H., Berth, G., Dautzenberg, H. (2001). Hydrodynamic studies on chitosans in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers*. 45, 373–383.
- Conti, B., Tabarean, I., Andrei, C. and Bartfai, T. (2004). Cytokines and fever. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 9, 1433-49.

- Cuero, R.G., Osuji, G., Washington, A. (1999). N-carboxymethyl chitosan inhibition of aflatoxin production: role of zinc. *Biotechnology Letters*, 13, 441-444.
- Cunha, F. Q. and Ferreira, S. H. (2003). Peripheral hyperalgesic cytokines. *Advances in experimental medicine and biology*, 521, 22-39.
- Czerska, M., Mikołajewska, K., Zieliński, M., Gromadzińska, J., Wąsowicz, W. (2015) Today's oxidative stress markers. *Medicine Pracy*. 66(3), 393-405.
- Dal Pozzo, A., Vanini, L., Fagnoni, M., Guerrini, M., De Benedittis, A. & Muzzarelli, R. A. A. (2000). Preparation and characterization of poly(ethylene glycol)-crosslinked deacetylated chitosans. *Carbohydrate Polymers*, 42(2), 201–206.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan - a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 36, 981-1014.
- Davydova, V.N., Yermak, I.M., Gorbach, V.I. Krasikova, I.N. Solov'eva T.F.(2000). Interaction of Bacterial Endotoxins with Chitosan. Effect of Endotoxin Structure, Chitosan Molecular Mass, and Ionic Strength of the Solution on the Formation of the Complex. *Biochemistry (Moscow)*, 65, (9), 1082-1090.
- Davydova, V.N., Naberezhnykh, G.A., Yermak, I.M., Gorbach, , I.N. Solov'eva T.F.(2006). Determination of Binding Constants of Lipopolysaccharides of Different Structure with Chitosan. *Biochemistry (Moscow)*, 71, (3) 332-339.
- Deacon, M. P., McGurk, S., Roberts, C. J., Williams, P. M., Tendler, S. J. B., Davies, M. C., Davis, S. S., Harding, S. E. (2000). Atomic force microscopy of gastric mucin and chitosan mucoadhesive systems. *Biochemical Journal*, 348, 557-563.
- Deng, L., C. Wang, E. Spencer, L. Yang, A. Braun, J. You, C. Slaughter, C. Pickart, and Z. J. Chen. (2000). Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell* 103,351-361.
- Dimozi, A., Mavrogenatou, E., Sklirou, A., Kletsas, D. (2015). Oxidative stress inhibits the proliferation, induces premature senescence and promotes a catabolic phenotype in human nucleus pulposus intervertebral disc cells. *European cells & materials*, 4(30) 89-102
- Domard, A. (1987). Determination of N-acetyl content in chitosan samples by c.d. measurements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 9(6), 333-336.
- Domard, A., Cartier, N. (1992). Glucosamine oligomers: 4. Solid state-crystallization and sustained dissolution. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14 (2), 100–106.
- Domard, A., Domard, M. (2002). Chitosan: structure–properties relationship and biomedical applications. In: Dumitriu S, editor. *Polymeric biomaterials*, New York: Marcel Dekker, 187-212.

- Dou, J., Xu, Q., Tan, C., Wang, W., Du, Y., Bai, X., et al. (2009). Effects of chitosan oligosaccharides on neutrophils from glycogen-induced peritonitis mice model. *Carbohydrate Polymers*, 75(1), 119-124.
- Du, Y., Zhao, Y., Dai, S., & Yang, B. (2009). Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10 (1), 103-107.
- Einbu, A., Vårum, K.M. (2007). Depolymerization and de-N-acetylation of chitin oligomers in hydrochloric acid. *Biomacromolecules*, 8, 309–314.
- Engelmann, J., Volk, J., Leyhausen, G., & Geurtsen, W. (2005). ROS formation and glutathione levels in human oral fibroblasts exposed to TEGDMA and camphorquinone. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 75B, 272-276.
- Errington, N., Harding, S.E., Vårum, K.M., Illum, L. (1993). Hydrodynamic characterization of chitosans varying in degree of acetylation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 15, (2), 113-117.
- Evans, C. M., Koo, J. S. (2009) Airway mucus: The good, the bad, the sticky. *Pharmacology & Therapeutics*, 121 (3) 332-348.
- Fan, Y., He, X., Zhou, S., Luo, A., He, T., & Chun, Z. (2009). Composition analysis and antioxidant activity of polysaccharide from dendrobium denneanum. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45 (2), 169-173.
- Farmacopea Europea. Consejo de Europa, 4ªEd. 2002, 1774-5 Monografía del hidrocloreto de quitosano.
- Farmacopea Europea. Consejo de Europa, 2011. Monografía del quitosano.
- Feng, T., Du, Y., Li, J., Hu, Y., & Kennedy, J. F. (2008). Enhancement of antioxidant activity of chitosan by irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 73(1), 126-132.
- Fernandes, J.C., Tavará, F.K., Soares, J.C., Ramos, O.S., Monteiro, M.J., Pintado, M.E., Malcata F.X. (2008). Antimicrobial effects of chitosans and chitooligosaccharides, upon *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, in food model systems. *Food Microbiology*, 25, 922– 928.
- Fernandes, J.C., Spindola, H., de Sousa, V., Santos-Silva, A., Pintado, M.E., Malcata F.X., Carvalho, J.E. (2010). Anti-Inflammatory Activity of Chitooligosaccharides *in Vivo*. *Marine Drugs*, 8, 1763-1768.
- Ferrari, C.K.B., Torres, E.A.F.S. (2003). Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 57 (5-6), 251-260.
- Fukamizo, T., Honda, Y., Goto, S., Boucher, I., Brzezinski, R. (1995). Reaction mechanism of chitosanase from *Streptomyces* sp. N174. *Journal of Biochemistry*, 311: 377-383.

- Fukamizo, T., Juffer, A. H., Vogel, H. J., Honda, Y., Tremblay, H., Boucher, I., et al. (2000). Theoretical calculation of pKa reveals an important role of Arg205 in the activity and stability of *Streptomyces* sp. N174 chitosanase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25633–25640.
- Galed, G., Miralles, B., Paños, I., Santiago, A., Heras, A. (2005). N-Deacetylation and depolymerization reactions of chitin/chitosan: Influence of the source of chitin. *Carbohydrate Polymers*, 62 (4), 316-320.
- Galed Ceresuela, Gemma. (2006). Biopolímeros Quitina/Quitosano: Optimización de los procesos de Obtención y Caracterización Funcional Estudios sobre Quitina y Quitosano. Tesis.
- Gao, Y., He, L., Katsumi, H., Sakane, T., Fuiita, T., Yamamoto, A. (2008). Improvement of intestinal absorption of insulin and water-soluble macromolecular compounds by chitosan oligomers in rats. *International Journal of Pharmacology*. 359, 70–78.
- Gerasimenko, D. V., Avdienko, I. D., Bannikova, G. E., Zueva, O. Y., Verlamov, V. P. (2004). Antibacterial effects of water-soluble low-molecular-weight chitosans on different microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40, 253–257.
- Ghuysen, J. (1971). 2.1 - bacterial walls and membranes. In Z. M. BACQ (Ed.), *Fundamentals of biochemical pharmacology* Pergamon, 143-152.
- Goycoolea, F.M., Argüelles-Monal, W., Peniche, C., Higuera-Ciapara, I. (2000). Chitin and chitosan, volume 41: 265-308.
- Gram, H.C. (1884). Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten». *Fortschr. Med.* 2: 185–189.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1988). Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease. *Human Toxicology* 7 (1): 7-13.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J., & Aruoma, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food Chemistry and Toxicology*, 33, 601–617.
- Hamer, S. N., Moerschbacher, B. M., Kolkenbrock, S. (2014). Enzymatic sequencing of partially acetylated chitosan oligomers. *Carbohydrate Research*, 392 (0), 16-20.
- Hamer, S. N., Cord-Landwehr, S., Biarnés, X., Planas, A., Waegeman, H., Moerschbacher, B. M., Kolkenbrock, S. (2015). Enzymatic production of defined chitosan oligomers with a specific pattern of acetylation using a combination of chitin oligosaccharide deacetylases. *Scientific Reports*, 3(5), 1786.
- Hancock I. C. (1991) Microbial Cell Surface Analysis (Mozes N., Handley P. S., Busscher H. J., Rouxhet P. G., editors. eds) VCH Publishing, Inc., New York, 23-59.
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E., & Berg, K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of Immunological Methods*, 119 (2), 203-210.

- Harris, R., Acosta, N., Heras, A. (2013). 6 - Chitosan and inhalers: A bioadhesive polymer for pulmonary drug delivery. In P. Prokopovich (Ed.), *Inhaler devices* (pp. 77-93) Woodhead Publishing.
- Hayden, M.S., West, A.P., Ghosh, S. (2006). NF-kappaB and the immune response. *Oncogene*. 25, 6758–6780.
- He, P., Davis, S. S., Illum, L., (1998). In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 166, 75-88.
- Helander, I.M., Nurmiäho-Lassila, E.L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 71,(2-3), 235–244.
- Heux, L., Brugnerotto, J., Desbrieres, J., Versali, M.F., Rinaudo, M. (2000) Solid state NMR for determination of degree of acetylation of chitin and chitosan. *Biomacromolecules*, 1, 746–51.
- Hirai, A., Odani, H., Nakajima, A. (1991). Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H- NMR spectroscopy. *Polymer Bulletin*, 26, 87-94.
- Hirano, S., Kondo, Y., Fujii, K. (1985). Preparation of acetylated derivatives of modified chito-oligosaccharides by the depolymerization of partially N-acetylated chitosan with nitrous-acid. *Carbohydrate Research* 144(2):338-341.
- Hirano, S., Nagao, N. (1989). Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53, 3065–3066.
- Hirano, H., Seino, Y., Akiyama, Y., Nonaka, I. (1990). Chitosan: a biocompatible material for oral and intravenous administration, in: C.G. Gebelein and R.L. Dunn (Eds.), *Progress in Biomedical Polymers*, Plenum Press, New York, 283-289.
- Hornung, V., Bauernfeind, F., Halle, A., Samstad, E. O., Kono, H., Rock, K. L., Fitzgerald, K. A., Latz, E. (2008). Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature Immunology*, 9, 847-56.
- Horton, D., Philips, K. D. (1973). The nitrous acid deamination of glycosides and acetates of 2-amino-2-deoxy-D-glucose. *Carbohydrate Research* 30, 367-374.
- Hsiao, Y-C., Lin, Y-W., Su, C-K., Chiang, B-H. (2008). High degree polymerized chitoooligosaccharides synthesis by chitosanase in the bulk aqueous system and reversed micellar microreactors. *Process Biochemistry*, 43 (1), 76-82.
- Hu, Y., Du, J. Yang, Y. Tang, J. Li y X. Wang. (2007). Self-aggregation and antibacterial activity of N-acetylated chitosan. *Polymer*, (11), 48, 3098-3106.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. (2002). High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System

Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *Journal of Agriculture. Food Chemistry*. 50, 4437–4444.

Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agriculture. Food Chemistry*. 53, 1841–1856.

Huang, J., Zhao, D., Hu, S., Mao, J., & Mei, L. (2012). Biochemical activities of lowmolecular weight chitosans derived from squid pens. *Carbohydrate Polymers*, 87(3), 2231–2236.

Huggins, M.L. (1942). The Viscosity of Dilute Solutions of Long-Chain Molecules. IV. Dependence on Concentration *Journal of the American Chemical Society*, 64 (11), 2716-2718.

Illum, L., Farraj, N.F., Davis, S.S. (1994) Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs, *Pharmacology Research*, 11, 1186-1189.

Illum, L., Jabbal-Gill, I., Hinchcliffe, M., Fisher, A.N., Davis, S.S. (2001) Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines, *Advanced in Drug Delivery Reviews*, 51, 81-96.

Ishiguro, K., Yoshie, N., Sakurai, M., & Inoue, Y. (1992). A ¹H-NMR study of a fragment of partially N-deacetylated chitin produced by lysozyme degradation. *Carbohydrate Research*, 237, 333-338.

Izume, M., & Ohtakara, A. (1987). Preparation of D-glucosamine oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan. *Agricultural and Biological Chemistry*, 51, 1189–1191.

Izume, M., Nagae, S., Kawagishi, H., Mitsutomi, M., Ohtakara, A. (1992). Action Pattern of *Bacillus* sp. No. 7-M Chitosanase on Partially N-Acetylated Chitosan. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 56: 448-453.

Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review Immunology*, 20, 197-216.

Je, J., Park, P., & Kim, S. (2004). Free radical scavenging properties of hetero-chitooligosaccharides using an ESR spectroscopy. *Food and Chemical Toxicology*, 42(3), 381-387.

Jeon, Y. J., Shahidi, F., & Kim, S. K. (2000). Preparation of chitin and Chitosan oligomers and their applications in physiological functional foods. *Food Reviews International*, 16(2), 159–176.

Jeon, Y. P., Park, P. J., & Kim, S. K. (2001). Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate Polymers*, 44, 71–76

Jintapattanakit, A., Mao, S., Kissel, B., Junyaprasert, V.B. (2008). Physicochemical properties and biocompatibility of N-trimethyl chitosan: Effect of quaternization and dimethylation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 70, 563–571.

- Johnson, G. L. and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-2.
- Jung, W.J., Park, R.D. (2014). Bioproduction of Chitooligosaccharides: Present and Perspectives. *Murine Drugs*, 12, 5328-5356.
- Jung, W.K., Park, P.J., Ahn, C.B., Je, J.Y. (2014). Preparation and antioxidant potential of maillard reaction products from (MRPs) chitooligomer. *Food Chemistry*, 145, 173–178
- Kamil, J.Y.V.A., Y-J. Jeon y F. Shahidi. (2002). Antioxidative activity of chitosans of different viscosity in cooked comminuted flesh of herring (*Clupea harengus*) *Food Chemistry*, (1), 79, 69-77.
- Kasaai, M. R. (2007). Calculation of Mark–Houwink–Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent–temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydrate Polymers*, 68: 477-488.
- Kasaai, M.R., Arul, J., Charlet, G. (2008). Fragmentation of chitosan by ultrasonic irradiation. *Ultrasonic Sonochemistry*, 15, 1001-1008.
- Kasaai, M.R. (2010). Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: A review. *Carbohydrate Polymers*, 79 (4), 801-810.
- Kayitmazer, A. B., Seyrec, E., Dubin, P. L., Staggemeier, B. A. (2003). Influence of chain stiffness on the interaction of polyelectrolytes with oppositely charged micelles and proteins. *Journal of Physical Chemistry*. 107, (32), 8158-8165.
- Khavari, T. A., Rinn, J. (2007). Ras/Erk MAPK signaling in epidermal homeostasis and neoplasia. *Cell Cycle*. 6 (23), 2928-2931.
- Kean, T., Thanou, M. (2010). Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62 (1), 3-11.
- Kim, J. Y., Lee, J. K., Lee, T. S., & Park, W. H. (2003). Synthesis of chitooligosaccharide derivative with quaternary ammonium group and its antimicrobial activity against *Streptococcus mutans*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 32, 23–27.
- Kim, K. W.; Thomas, R. L. (2007). Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Food Chemistry*, 101, 308–313.
- Kim, S-K., Rajapakse, N. (2005). Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrates Polymers*, (4), 62, 357-368.
- Kim, J., Kim, J., Hong, J., Lee, S., Park, S., Lee, J., et al. (2013). LC–MS/MS analysis of chitooligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 372, 23-29.

- Knäul, J. Z., Kasaai, M. R., Bui, V. T. & Creber, K. A. M. (1998). Characterization of deacetylated chitosan and chitosan molecular weight review. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*, 76(11), 1699–1706.
- Kolaczowska, E, Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Review Immunology*, 13(3):159-75.
- Kong, M., X.G. Chen, K. Xing y H.J. Park. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal Food Microbiology*,(1), 144, 51-63.
- Kumar, M.M., Muzzarelli, R.A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., Dom, A.J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews*, 10: 6017-6084.
- Kumirska, J., Weinhold, M.X., Sauvageau, J.C.M, Thöming, J., Kaczynski, Z., Stepnowski, P. (2009a). Determination of the pattern of acetylation of low-molecular-weight chitosan used in biomedical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50, 587–590
- Kumirska, J., Weinhold, M.X., Steudteb, S., Thöming, J., Brzozowski, K., Stepnowski, P. (2009b). Determination of the pattern of acetylation of chitosan samples: Comparison of evaluation methods and some validation parameters. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 56–60.
- Kurita, K., Sannan, T., Iwakura, Y. (1977). Studies on chitin, 4. Evidence for formation of block and random copolymers of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine by hetero- and homogeneous hydrolyses. *Die Makromolekulare Chemie*, 178 (12) 3197-3202.
- Kurita, K., Kamiya, M., Nishimura, S.I. (1991). Solubilization of a rigid polysaccharide: controlled partial N-acetylation of chitosan to develop solubility. *Carbohydrate Polymer*, 1 (16), 83-92.
- Kurita, K. (1998). Chemistry and application of chitin and chitosan. *Polymer Degradation and Stability Biodegradable Polymers and Macromolecules*, 59 (1-3), 117-120.
- Kuroiwa, T., Y. Noguchi, M. Nakajima, S. Sato, S. Mukataka y S. Ichikawa. (2008). Production of chitosan oligosaccharides using chitosanase immobilized on amylose-coated magnetic nanoparticles. *Process Biochemistry*, 43 (1) 62-69.
- Lai, S. K., Wang, Y. Y., Wirtz, D., Hanes, J., (2009). Micro- and macrorheology of mucus. *Advances Drug Delivery Review.*, 61, 86-100.
- Lamarque, G., Viton, C., Domard, A. (2004). Comparative study of the first heterogeneous deacetylation of a- and b-chitins in a multistep process. *Biomacromolecules*, 5, 992–1001.
- Lamarque, G., Chaussard, G., Domard, A. (2007). Thermodynamic aspects of the heterogeneous deacetylation of beta-chitin: reaction mechanisms. *Biomacromolecules*, 8, 1942–1950.

- Larsen M. H., Leisner, J., Ingmer, H. (2010). The Chitinolytic Activity of *Listeria monocytogenes* EGD Is Regulated by Carbohydrates but Also by the Virulence Regulator PrfA. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (19) 6470–6476.
- Lavertu, M., Darras, V., Buschmann, M.D., (2012). Kinetics and efficiency of chitosan reacetylation. *Carbohydrate Polymers*, 87, 1192-1198.
- Lee, J. D., Ulevitch, R. J. and Han, J. (1995). Primary structure of BMK1: a new mammalian map kinase. *Biochemical and biophysical research communications*. 213, 715-24.
- Lee, S. H., Senevirathne, M., Ahn, C. B., Kim, S. K., & Je, J. Y. (2009). Factors affecting anti-inflammatory effect of chitooligosaccharides in lipopolysaccharides induced RAW264.7 macrophage cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19, 6655-6658.
- Lehr, C.-M., Bouwstra, J. A., Schacht, E. H., Junginger, H. E., (1992). In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. *International Journal of Pharmaceutics*, 78, 43-48.
- Leisner, J. J., Larsen, M. H., Jørgensen, R. L., Brøndsted, L., Thomsen, L. E., Ingmer, H. (2008). Chitin hydrolysis by *Listeria* spp., including *L. monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 74, 3823–3830.
- Li, K., Xing, R., Liu, S., Qin, Y., Li, B., Wang, X., et al. (2012). Separation and scavenging superoxide radical activity of chitooligomers with degree of polymerization 6–16. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(5), 826-830.
- Li, K., Liu, S., Xing, R., Qin, Y., Li, P. (2013). Preparation, characterization and antioxidant activity of two partially N-acetylated chitotrioses. *Carbohydrate Polymers*, 92, 1730– 1736.
- Li, J., Du, Y., Yang, J., Feng, T., Li, A., & Chen, P. (2005). Preparation and characterisation of low molecular weight chitosan and chito-oligomers by a commercial enzyme. *Polymer Degradation and Stability*, 87(3), 441-448.
- Li, J., Y. Du y H. Liang. (2007). Influence of molecular parameters on the degradation of chitosan by a commercial enzyme *Polymer Degradation and Stability*, (3), 92, 515-524.
- Lin, C.W., Chen, L.J., Lee, P.L., Lee, C.I., Lin, J.C., Chiu, J.J. (2007). The inhibition of TNF- α -induced E-selectin expression in endothelial cells via the JNK/NF-kB pathways by highly N-acetylated chitooligosaccharides. *Biomaterials*, 28, 1355–1366.
- Lin, F., Jia, X.G., Lei, W.X., Li, Z.J., Zhang, T.Y. (2009). Spectra analyses of chitosans degraded by hydrogen peroxide under optimal conditions. *Spectroscopy Spectral Analysis*, 29, 43–47.
- Lin, S., Lin, Y., & Chen, H. (2009). Low molecular weight chitosan prepared with the aid of cellulase, lysozyme and chitinase: Characterisation and antibacterial activity. *Food Chemistry*, 116(1), 47–53.

- Liu, H., Bao, J., Du, Y., Zhou, X., & Kennedy, J. F. (2006). Effect of ultrasonic treatment on the biochemophysical properties of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 64(4), 553–559.
- Liu, H., Li, W., Xu, G., Li, X., Bai, X., Wei, P., et al. (2009). Chitosan oligosaccharides attenuate hydrogen peroxide-induced stress injury in human umbilical vein endothelial cells. *Pharmacological Research*, 59(3), 167-175.
- Madigan M, Martinko J (editors). (2005). Brock Biology of Microorganisms (Decimoprimer edición). Prentice Hall
- Maghami, G. G. & Roberts, G. A. F. (1988). Evaluation of the viscometric constants for chitosan. *Makromolekulare Chemie*, 189(1), 195–200.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. and Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912-34.
- Marchand, F., Perretti, M., McMahon, S. B. (2005). Role of the immune system in chronic pain. *Nature Review Neuroscience*, 6, 521-32.
- Mebratu, Y., Tesfaigzi, Y. (2009). How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle*. 8,(8,), 1168-1175.
- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819-26.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428-35.
- Mengíbar, M., Ganan, M., Miralles, B., Carrascosa, A.V., Martínez-Rodríguez, A.J., Peter, M.G., Heras, Á. (2011). Antibacterial activity of products of depolymerization of chitosans with lysozyme and chitosanase against *Campylobacter jejuni*. *Carbohydrate Polymers*, 84, 844-848.
- Mengíbar, M., Mateos-Aparicio, I., Miralles, B., & Heras, Á. (2013). Influence of the physico-chemical characteristics of chito-oligosaccharides (COS) on antioxidant activity. *Carbohydrate Polymers*, 97 (2), 776-782.
- Miralles, B., Martinez-Rodriguez, A., Santiago, A., J. van de Lagemaat, Heras, A. (2007). The occurrence of a Maillard-type protein-polysaccharide reaction between [beta]-lactoglobulin and chitosan. *Food Chemistry*, (3), 100, 1071-1075.
- Moon, M. L., L. K. McNeil, and G. G. Freund. (2011). Macrophages make me sick: how macrophage activation states influence sickness behavior. *Psychoneuroendocrinology* 36, (10), 1431-1440.
- Morales, F. J., & Jimenez-Perez, S. (2001). Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chemistry*, 72, 119–125
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65 (1–2), 55-63.

- Muanprasat, C., Wongkrasant, P., Satitsri, S., Moonwiryakit, A., Pongkorpsakol, P., Mattaveewong, T., et al. (2015). Activation of AMPK by chitosan oligosaccharide in intestinal epithelial cells: Mechanism of action and potential applications in intestinal disorders. *Biochemical Pharmacology*, 96(3), 225-236.
- Murray, P. J., Wynn, T. A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Review Immunology*, 11, 723-737.
- Muzzarelli R. A. A., Rochetti R. (1985). Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, 5, 461–72.
- Muzzarelli, R. A. A., Stanic, V., & Ramos, V. (1999). Enzymatic depolymerization of chitins and chitosans. In C. Bucke (Ed.), *Methods in Biotechnology: Carbohydrate Biotechnology Protocols*. Totowa: Humana Press.
- Muzzarelli, R. A. A. (2009). Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers*, 76, 167e182.
- Naberezhnykh, G.A., Gorbach, V.I., Likhatskaya, G.N., Davidova V.N., Solov'eva, T.F. (2008). Interaction of Chitosans and Their N-Acylated Derivatives with Lipopolysaccharide of Gram-Negative Bacteria. *Biochemistry (Moscow)*, 73(4), 432-441.
- Naberezhnykh, G.A., Gorbach, V.I., Kalmykova, E.N., & Solov'eva, T.F. (2015). Determination of the parameters of binding between lipopolysaccharide and chitosan and its N-acetylated derivative using a gravimetric piezoquartz biosensor. *Biophysical Chemistry*, 198, 9-13.
- Nafea, E.A., Moselhy, W.A., Fawzy A.M. (2011) Does the HMF value affect the Antibacterial activity of the Bee Honey? *Egypt. Acad. J. biolog. Sci.* 4 (1), 13-19.
- NTP, National Toxicology Program (2010). Tech Rep Ser. (554), 7-13, 15-9, 21-31 passim.
- Ngo, D., Vo, T., Ngo, D., Kang, K., Je, J., Pham, H. N., et al. (2015). Biological effects of chitosan and its derivatives. *Food Hydrocolloids*, 51 (0), 200-216.
- Ngo, D., Qian,Z.J., Vo, T., Ryu, B., Ngo,D.N., Kim, S.K. (2011a). Antioxidant activity of gallate-chitooligosaccharides in mouse macrophage RAW264.7 cells. *Carbohydrate Polymers*, 84, 1282–1288.
- Ngo, D., Wijesekara, I., Vo, T., Van Ta, Q., & Kim, S.K. (2011b). Marine food-derived functional ingredients as potential antioxidants in the food industry: An overview. *Food Research International*, 44 (2), 523-529.
- Nguyen, S., Hisiger, S., Jolicoeur, M., Winnik, F. M., Buschmann, M.D. (2009). Fractionation and characterization of chitosan by analytical SEC and ¹H NMR after semi-preparative SEC. *Carbohydrate Polymers*, 75 (4), 636-645.

- Nidheesh, T., Pal, G. K., & Suresh, P. V. (2015). Chitooligomers preparation by chitosanase produced under solid state fermentation using shrimp by-products as substrate. *Carbohydrate Polymers*, 121 (0), 1-9.
- Ninomiya-Tsuji, J., K. Kishimoto, A. Hiyama, J. Inoue, Z. Cao, and K. Matsumoto. (1999). The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature* 398, 252-256.
- Niu, J., Lin, H., Jiang, S., Chen, X., Wu, K., Liu, Y., et al. (2013). Comparison of effect of chitin, chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-d-glucosamine on growth performance, antioxidant defenses and oxidative stress status of penaeus monodon. *Aquaculture*, 372–375, 1-8.
- No, H.K., N.Y. Park, S.H. Lee y S.P. Meyers. (2002) Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal Food Microbiology*, (1-2), 74, 65-72.
- Nunomura, A., Castellani, R., Zhu, X., Moreira, P., Perry, G., Smith, M.A. (2006). Involvement of oxidative stress in Alzheimer disease. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 65 (7), 631-641.
- Ocloo, F.C.K., Quayson, E.T., Adu-Gyamfi, A., Quarcoo, E.A., Asare, D., Serfor-Armah, Y., et al. (2011). Physicochemical and functional characteristics of radiation-processed shrimp chitosan. *Radiation Physics and Chemistry*, 80, 837-41.
- Ohtakara, A. (1988) Chitosanase from *Streptomyces griseus*. *Methods in Enzimology*, 161, 505-510.
- Ostro, M.J. Liposomes (1983).
- Ott, C., Jacobs, K., Haucke, E., Navarrete Santos, A., Grune, T., & Simm, A. (2014). Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biology*, 2, 411-429.
- Ottøy, M.H., K.M. Vårum, B.E. Christensen, M.W. Anthonsen y O. Smidsrød. (1996a). Preparative and analytical size-exclusion chromatography of chitosans. *Carbohydrate Polymers*, 31, 253-261.
- Ottoy, M. H., Vårum, K. M., & Smidsrod, O. (1996b). Compositional heterogeneity of heterogeneously deacetylated chitosans. *Carbohydrate Polymers*, 29, 17–24.
- Phaechamud, T., (2008). Hydrophobically modified chitosans and their pharmaceutical applications. *Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 1, 2–9.
- Park, P.J., Je, J.Y., & Kim, S.K. (2003). Free radical scavenging activity of chitooligosaccharides by electron spin resonance spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4624–4627.

Park, S.I., Daeschely M.A., Zhao Y. (2004) Functional properties of antimicrobial lysozyme chitosan composite films. *Journal of Food Science*, 69, 215-221.

Park, S.C., Nam, J.P., Kim J.H., Kim Y.M., Nah J.W., Jang, M.K. (2015). Antimicrobial Action of Water-Soluble β -Chitosan against Clinical Multi-Drug Resistant Bacteria. *International Journal Molecular Science*, 16, 7995-8007.

Peng, C., Y. Wang, Y. Tang. (1998). Synthesis of crosslinked chitosan-crown ethers and evaluation of these products as adsorbents for metal ions *Journal Applied Polymer Science*, (3), 70, 501-506.

Peña, Arroyo, Gómez, Tapia, Gómez (2004) Bioquímica. ISBN 968-18-2660-4

Peppas, N. A., Buri, P. A., (1985). Surface, interfacial and molecular aspects of polymer bioadhesion on soft tissues. *J. Controlled Release*, 2, 257-275.

Peppas, N. A., Sahlin, J. J., (1996). Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. *Biomaterials*, 17, 1553-61.

Peri, F., Piazza, M., Calabrese, V., Damore, G., & Cighetti, R. (2010). Exploring the LPS/TLR4 signal pathway with small molecules. *Biochemical Society Transactions*, 38(5), 1390–1395.

Perilla, J. E. y B. M. Vallejo (2008). Desarrollo de materiales bioadherentes y biodegradables a partir de copolímeros derivados del ácido láctico. Bogotá, Dirección de Investigación sede Bogotá - Universidad Nacional de Colombia.

Pillai, C. K. S., Paul, W., & Sharma, C. P. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34(7), 641-678.

Prashanth, H.K.V., & Thanranatha, R.N. (2005). Depolymerized products of chitosan as potent inhibitors of tumor-induced angiogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta e General Subjects*, 1722, 22-29.

Prashanth, H.K.V., & Thanranatha, R.N. (2007). Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential – an overview. *Trends Food Science Technology*, 18,117–31.

Pristovsek, P., Kidric, J. (1999). Solution structure of polymyxins B and E and effect of binding to lipopolysaccharide: an NMR and molecular modeling study. *Journal Medicine Chemistry*, 42, 4604–4613.

Pulido, R., L. Bravo y F. Saura-Calixto. (2000).Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. *Journal of agricultural chemistry*, (8), 48, 3396-3402.

Qiao, Y., Bai, X., & Du, Y. (2011). Chitosan oligosaccharides protect mice from LPS challenge by attenuation of inflammation and oxidative stress. *International Immunopharmacology*, 11 (1), 121-127.

Raafat, D., K. von Bargen, A. Haas y H-G. Sahl. (2008). Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. *Applied and Enviromental Microbiology*, (12), 74, 3764-3773.

Rabea, E.I., Badawy, M.E.T., Stevens, C.V., Smagghe, G., Steurbaut, W.,. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4, 1457–1465.

Rao, M. S., Chawla, S. P., Chander, R., & Sharma, A. (2011). Antioxidant potential of Maillard reaction products formed by irradiation of chitosan–glucose solution. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 714–719.

Ravi Kumar, M.N.V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46 (1) 1–27.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9–10), 1231-1237.

Reuter, S., Gupta, S. C., Chaturvedi, M. M., & Aggarwal, B. B. (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radical Biology and Medicine*, 49, 1603-1616.

Rhee, S.G. (2006). Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*. 312, (5782) 1882–1883.

Ricevuti, G., Mazzone, A., Fossati, G., Mazzucchelli, I., Cavigliano, P.M., Pasotti, D., Notario, A. (1993). Assay of phagocytic cell functions. *Allerg Immunol (Paris)*. 25(2):55-66.

Rinaudo, M., Le Dung, P., Gey, C., Milas, M. (1992). Substituent distribution on O, N-carboxymethylchitosans by ¹H and ¹³C NMR. *International Journal of Biological Macromolar*, 14:122–8.

Rinaudo, M., Milas, M., Dung, P.L. (1993). Characterization of chitosan: Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. *International Journal of Biological Macromolecules*, 15 (5), 281-285.

Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632.

Rinaudo, M. (2008). Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*, 57, (3): 397-430.

Roberts, G.A.F., Domszy, J.G. (1982). Determination of the viscometric constants for chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 4 (6), 374-377.

Roberts, G.A.F. (2008). Thirty years of progress in chitin and chitosan. Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives. *Polish Chitin Society, Lóz, Poland. Volume XIII*.

Rock, K. L., Kono, H. (2008). The inflammatory response to cell death. *Annual Review of Pathology*, 3, 99-126.

Rodrigues, S., Dionísio, M., López, C.R., Grenha, A. (2012). Biocompatibility of chitosan carriers with application in drug delivery. *Journal of Functional Biomaterials*, 3 (3), 615-641.

Rossi, S., Ferrari, F., Bonferoni, M. C., Caramella, C., (2001). Characterization of chitosan hydrochloride-mucin rheological interaction: influence of polymer concentration and polymer:mucin weight ratio. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12, 479-485.

Rusu-Balaita L, Desbrieres J, Rinaudo M. (2003). Formation of a biocompatible polyelectrolyte complex: chitosan-hyaluronan complex stability. *Polymer Bulletin*, 50, 91–8.

Roux, P. P. and Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and molecular biology reviews*, 68, 320-44.

Sabio, G., Davis, R. J. (2014). TNF and MAP kinase signalling pathways. *Seminars in Immunology*, 26 (3), 237-245.

Saito H, Tabeta R, Ogawa K. (1987). High-resolution solid-state ¹³C NMR study of chitosan and its salts with acids: conformational characterization of polymorphs and helical structures as viewed from the conformation-dependent ¹³C chemical shifts. *Macromolecules*, 20:2424–30.

Sakajiri, T., Kikuchi, T., Simon, I., Uchida, k., Yamamura, T., Ishii, T., Yajima, H. (2006). Molecular dynamics approach to study the discrepancies in the thermal behavior of amylose and chitosan conformations. *Journal of Molecular Structure: Theochem*, 764: 133-140.

Sannan, T., Kurita, K., Iwakura, Y. (1975). Studies on chitin, 1. Solubility change by alkaline treatment and film casting. *Die Makromolekulare Chemie*, 176 (4), 1191-1195.

Schatz, C., Pichot, C., Delair, T., Viton, C., Domard, A. (2003a). Static light scattering studies on chitosan solutions: from macromolecular chains to colloidal dispersions. *Langmuir*, 19(23), 9896–9903.

Schatz, C., Viton, C., Delair, T., Pichot, C., Domard, A. (2003b). Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution. *Biomacromolecules*, 4, 641-648.

Schmidt, A.M., Vianna, M., Gerlach, M, et al. (1992) Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 14987–97.

Seki, K. y David A. Tirrell. (1984). pH-Dependent complexation of poly(acrylic acid) derivatives with phospholipid vesicle membranes. *Macromolecules*, (9), 17, 1692-1698.

Serhan, C. N. and Savill, J. (2005). Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nature Immunology*, 6, 1191-7.

Serhan, C. N. (2007). Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annual Review Immunology*, 25, 101-37.

Shigemasa, Y., Saito, K., Sashiwa, H. & Saimoto, H. (1994). Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. *International Journal of Biological Macromolecules*, 16(1), 43-49.

Shikhman, A.R., Kuhn, K., Alaaeddine, N., Lotz, M. (2001). N-Acetylglucosamine prevents IL-1 β -mediated activation of human chondrocytes. *Journal Immunology*. 166, 5155-5160. 5.

Simm, A. (2013). Protein glycation during aging and in cardiovascular disease. *Journal of Proteomics*, 92, 248-259.

Smart, JD. (2005). The basics and underlying mechanisms of mucoadhesión. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1556- 1568.

Soane, R.J. Frier, M. Perkins, A.C. Jones, N.S. Davis, S.S. Illum, L. (1999) Evaluation of the clearance characteristics of bioadhesive systems in humans. *International Journal of Pharmacology*, 178, 55-65.

Sogias, I. A., Williams, A. C., Khutoryanskiy, V. V., (2008). Why is Chitosan Mucoadhesive? *Biomacromolecules*, 9, 1837-1842.

Somashekar, D., Joseph, R. (1996). Chitosanases — properties and applications: A review. *Bioresource Technology*, 55 (1), 35-45.

Song, J. Y., Alnaeeli, M., & Park, J. K. (2014). Efficient digestion of chitosan using chitosanase immobilized on silica-gel for the production of multisize chitooligosaccharides. *Process Biochemistry*, 49 (12), 2107-2113.

Sorlier, P., Denuziere, A., Viton, C., Domard, A. (2001). Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan. *Biomacromolecules*, 2(3), 765-772.

Sorlier, P., Viton, C., Domard, A. (2002). Relation between solution properties and degree of acetylation of chitosan: role of aging. *Biomacromolecules*, 3, 1336-1342.

Stranda, S.P., T. Nordengenb, K. Otgaard. Efficiency of chitosans applied for flocculation of different bacteria (2002). *Water Research*, 36, 4745-4752

Sudarshan, N.R., D.G. Hoover y D. Knorr. Antibacterial action of chitosan (1992). *Food Biotechnol*, (3), 6, 257-272.

Sun, T., Zhou, D., Xie, J., Mao, F. (2006). Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity. *European Food Research and Technology*, 225 (3).

- Sun, T.; Yao, Q.; Zhou, D.; Mao, F. (2008). Antioxidant activity of *N*-carboxymethyl chitosan oligosaccharides. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*. 18, 5774–5776.
- Szymanska, E., Winnicka, K. (2015). Stability of Chitosan—A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Marine Drugs*, 13, 1819-1846.
- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Dommes, J. (2009). Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. *Food Chem.* 113, 1226-1233.
- Takahashi, T., Imaia, M., Suzukia, I., Sawai J. (2008). Growth inhibitory effect on bacteria of chitosan membranes regulated with deacetylation degree. *Biochemical Engineering Journal*, 40, 485–491.
- Tanabe, T., Kazuko, M., Tamo, F., Masaru, M. (2003). Novel chitosanase from *Streptomyces griseus* HUT 6037 with transglycosylation activity. *Bioscience, biotechnology and biochemistry*, 67 (2): 354-364.
- Thadathil, N., & Velappan, S. P. (2014). Recent developments in chitosanase research and its biotechnological applications: A review. *Food Chemistry*, 150(0), 392-399.
- Thanou, M., Verhoef, J.C., Junginger, H.E. (2001). Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives, *Advanced Drug Delivery Reviews*. (52), 117–126.
- Thompson, J. M., & Iwasaki, A. (2008). Toll-like receptors regulation of viral infection and disease. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(7), 786-794.
- Tian, M., Chen, F., Dawei, R., *et al.* (2010). Preparation of a series of chitooligomers and their effect on hepatocytes. *Carbohydrate Polymer* 79, 137-44.
- Tomas, D., Karin, K., Stephanie, D., & Imre, B. (2005). Analysis of Amadori compounds by high-performance cation exchange chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 77, 140–147.
- Tomida, H., Fujii, T., Furutani, N., Michihara, A., Yasufuku, T., Akasaki, K., *et al.* (2009). Antioxidant properties of some different molecular weight chitosans. *Carbohydrate Research*, 344(13), 1690–1696.
- Tsai ,G-J., W-H. Su, H-C. Chen y C-L. Pan. (2002).Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Science*, (1), 68, 170-177.
- Tsaih, M.L., Chen, Y. R.H. (2003). The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan. *Journal Applied Polymer Science*, 88 (13), 2917-2923.
- Tsao, C. T., Chang, C. H., Lin, Y. Y., Wu, M. F., Han, J. L., & Hsieh, K. H. (2011). Kinetic study of acid depolymerization of chitosan and effects of low molecular weight chitosan on erythrocyte rouleaux formation. *Carbohydrate Research*, 346(1), 94–102.

- Tømmeraas, K., Vårum, K.M., Christensen, B.E., Smidsrød, O. (2001). Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans. *Carbohydrate Research*, 333 (2), 137-144.
- Turner, B. S., Bhaskar, K. R., Hadzopoulou-Cladaras, M., LaMont, J. T., (1999). Cysteine rich regions of pig gastric mucin contain von Willebrand factor and cystine knot domains at the carboxyl terminal. *Bba-Gene Struct Expr*, 1447, 77-92.
- Ulevitch, R. J. (2000). Molecular mechanisms of innate immunity. *Immunological Research*, 21, 49–54.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39, 44-84.
- Van der Vliet, A., Janssen-Heininger Y. M. W. (2014). Hydrogen peroxide as a damage signal in tissue injury and inflammation: Murderer, mediator, or messenger? *Journal of Cellular Biochemistry* 115 (3), 427–435.
- Van Ginderachter, J. A., K. Movahedi, G. Hassanzadeh Ghassabeh, S. Meerschaut, A. Beschin, G. Raes, P. De Baetselier. (2006). Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology* 211, 487-501.
- Van Klinken, B. J., Dekker, J., Buller, H. A., Einerhand, A. W., (1995). Mucin gene structure and expression: protection vs. adhesion. *Am. J. Physiol.* 269, G613-27.
- Vårum, KM, Anthonsen, MW, Grasdalen, H, Smisrød O. (1991a). Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r. spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 211, 17–23.
- Vårum, KM, Anthonsen, MW, Grasdalen, H, Smisrød O. (1991b). ¹³C-NMR studies of the acetylation sequences in partially N-deacetylated chitins (chitosans). *Carbohydrate Research*, 217, 19–27.
- Vårum, K.M., Holme, H.K., Izume, M., Torger- Stokke B., Smidsrød, O. (1996). Determination of enzymatic hydrolysis specificity of partially N-acetylated chitosans. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) General Subjects*, 1291 (1): 5-15.
- Vårum, K.M., Myhr, M.M., Hjerde, R.J., Smidsrød, O. (1997). In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. *Carbohydrate Research*, 299 (1-2), 99-101.
- Vårum, K.M., Ottøy, M.H., Smidsrød, O. (2001). Acid hydrolysis of Chitosan. *Carbohidrate polymers*, 46, 89-98.
- Vo, T. S., Ngo, D. H., & Kim, S. K. (2012). Potential targets for anti-inflammatory and anti-allergic activities of marine algae: an overview. *Inflammation and Allergy Drug Targets*, 11, 90-101.

- Wang, W., S. Bo, S. Li y W. Qin. (1991). Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. *International Journal of Biological Macromolecules*, (5), 13, 281-285.
- Wang, J., Zhou, W., Yuan, H., & Wang, Y. (2008). Characterization of a novel fungal chitosanase Csn2 from *Gongronella* sp. *JG. Carbohydrate Research*, 343(15), 2583–2588.
- Wang, J., B. Sun, Y. Cao y Y. Tian. (2009). Protein glycation inhibitory activity of wheat bran feruloyl oligosaccharides. *Food Chemistry*, (2), 112, 350-353.
- Weinhold, M.X., Sauvageau, J.C.M., Keddig, N., Matzke, M., Tartsch, B., Grunwald, I., Kübel, C., Jastorff, B., Thöming, J. (2009a). Strategy to improve the characterization of chitosan for sustainable biomedical applications: SAR guided multi-dimensional analysis. *Green Chemistry*, 11, 498-509.
- Weinhold, M. X., Sauvageau, J. C. M., Kumirska, J., & Thöming, J. (2009b). Studies on acetylation patterns of different chitosan preparations. *Carbohydrate Polymers*, 78(4), 678-684.
- Wu, H, Yao, Z, Bai, X, Du, Y, Lin, B. (2008) Anti-angiogenic activities of chitooligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 73, 105–110.
- Wu, T., Zivanovic, S., Hayes, D.G., Weiss, J. (2008). Efficient reduction of chitosan molecular weight by high-intensity ultrasound: Underlying mechanism and effect of process parameters. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 56, 5112–5119.
- Wu, S. (2011). Preparation of water soluble chitosan by hydrolysis with commercial α -amylase containing chitosanase activity. *Food Chemistry*, 128(3), 769–772.
- Wyatt PJ. (1992). Combined differential light scattering with various liquid chromatography separation techniques. In: Harding SE, Sattelle DB, Bloomfield VA, editors. *Laser light scattering in biochemistry and polymer science*. Cambridge (UK): Royal Society of Chemistry. p. 35–38.
- Wyngaard, J., Iorio, M. I. (2000). Pesquerías de argentina 1997-1999. 267-274
- Xia, W., Liu, P., Zhang, J., Chen, J. (2011). Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25: 170-179.
- Xia Wu, S., & Chen, J. (2013). Preparation of water soluble chitosan by hydrolysis using hydrogen peroxide. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 242–245.
- Xie, W., Xu, P., & Liu, Q. (2001). Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 11, 1699–1701.
- Xie, Y.J., Liu, X.F., Chen, Q., (2007). Synthesis and characterization of water-soluble chitosan derivate and its antibacterial activity. *Carbohydrate Polymers* 69, 142–147.

- Xing, R.E., Liu, S., Yu, H.H., Guo, Z.Y., Wang, P.B., Li, C.P., Li, Z., Li, P.C. (2005) Salt-assisted acid hydrolysis of chitosan to oligomers under microwave irradiation. *Carbohydrate Research*, 340, 2150–2153.
- Xue, C., Yu, G. T., Hirata, J., Terao, J., & Lin, H. (1998). Antioxidative activities of several marine polysaccharides evaluated in a phosphatidylcholine-liposomal suspension and organic solvents. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 62, 206–209.
- Yang, H., Park, K. H., Kim, H. S., & Kim, J. (2010). Characterization of unknown compounds from stainless steel plates in matrix-assisted laser Desorption/Ionization mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 21 (12), 2000-2004.
- Yermak, I. M., Davidova, V. N., Gorbach, V. I., Luk'yanov, P. A., Solov'eva, T. F., Ulmer, A. J., et al. (2006). Forming and immunological properties of some lipopolysaccharide–chitosan complexes. *Biochimie*, 88 (1), 23-30.
- Yoksan, R., Akashi, M., Miyata, M., Chirachanchai, S. (2004). Optimal gamma-ray dose and irradiation conditions for producing low-molecular-weight chitosan that retains its chemical structure. *Radiation Research*, 161, 471–480.
- Yoon, H. J., Moon, M. E., Park, H. S., Im, S. Y., & Kim, Y. H. (2007). Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264.7 macrophage cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358 (3), 954-959.
- Younes, I., Sellimi, S., Rinaudo, M., Jellouli, K., Nasri, M. (2014). Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. *International Journal of Food Microbiology*, 185, 57-63.
- Younes, I., Rinaudo, M. (2015). Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Marine Drugs*, 13, 1133-1174.
- Yousef, M., Pichyangkura, R., Soodvilai, S., Chatsudthipong, V., & Muanprasat, C. (2012). Chitosan oligosaccharide as potential therapy of inflammatory bowel disease: Therapeutic efficacy and possible mechanisms of action. *Pharmacological Research*, 66 (1), 66-79.
- Yue, W., Yao, P., Wei, Y. (2009). Influence of ultraviolet-irradiated oxygen on depolymerization of chitosan. *Polymer Degradation and Stability*, 94, 851-858.
- Yue, W. (2014). Prevention of browning of depolymerized chitosan obtained by gamma irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 101, 857-863.
- Zhao, L., Chen, J., Su J., Li, L., Hu, S., Li, B., Zhang, X., Xu, Z., Chen, T. (2013). In Vitro Antioxidant and Antiproliferative Activities of 5-Hydroxymethylfurfural. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61, 10604–10611.
- Zeng, L., Qin, C., Chi, W., Wang, L., Ku, Z., & Li, W. (2007). Browning of chitooligomers and their optimum preservation. *Carbohydrate Polymers*, 67 (4), 551-558.

Zhang, H., Du, Y., Yu, X., Mitsutomi, M., Aiba, S. (1999). Preparation of chitooligosaccharides from chitosan by a complex enzyme. *Carbohydrate Research*, 320, 257–260.

Zhang, H., & Neau, S. H. (2001). In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: Effect of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials*, 22 (12), 1653-1658.

Zhang, J., Xia, W., Liu, P., Cheng, Q., Tahirou, T., Gu, W., et al. (2010). Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications. *Marine Drugs*, 8, 1962-1987.

Zhou, W., Shan, J., Tan, X., Zoua, J., Yin, A., Cai, B., Di, L. (2014). Effect of chito-oligosaccharide on the oral absorptions of phenolicacids of Flos Lonicerae extract, *Phytomedicine*, 21, 184-194.

Zou, P., Yang, X., Wang, J., Li, Y., Yu, H., Zhang, Y., et al. (2016). Advances in characterization and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides. *Food Chemistry*, 190, 1174–1181

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla IV.1. Características fisicoquímicas de los quitosanos originales.	79
Tabla IV.2. Grado de acetilación (%) de los quitosanos de partida, de los quitosanos modificados y de los COS obtenidos mediante P1, P2 y P3.	84
Tabla IV.3. Grado de acetilación (DA, %) y patrón de acetilación (PA) de los COS 2 (M_w 10-5 kDa) obtenidos mediante P1, P2 y P3.....	93
Tabla IV.4. Peso molecular promedio (\overline{M}_w) e índice de polidispersidad (PDI) de los productos de hidrólisis obtenidos mediante P1, P2 y P3.	97
Tabla IV.5. Abundancia total (%) de moléculas con distinto número de acetilaciones detectadas mediante MALDI-TOF-MS.....	103
Tabla IV.6. Porcentaje de inhibición del crecimiento bacteriano (IIRC) respecto al control (sin tratamiento) de los COS procedentes de QsB mediante P1 y P2.....	109
Tabla IV.7. Abundancia total (%) de oligómeros con distinto número de acetilaciones detectadas en los productos de hidrólisis de COS 1 P1 y COS 1 P2 procedentes de QsB tras la hidrólisis con CTS.	113
Tabla IV.8. Capacidad antioxidante (TEAC, μEq trolox/g de COS) de las fracciones de COS más activas y sus características fisicoquímicas.....	122
Tabla IV.9. Coeficiente de correlación (R) entre ensayos de capacidad antioxidante para cada uno de los procesos de obtención de COS a partir de cada quitosano.	127
Tabla IV.10. Características de la interacción entre la mucina y los COS.	131
Tabla IV.11. Tratamiento aplicado a los distintos grupos de ratones.	135
Tabla IV.12. Parámetros fisicoquímicos de las muestras empleadas para el estudio de la actividad antiinflamatoria.	146
Tabla IV.13. Abundancia total (%) con distinto número de acetilaciones y rango de DP que se detectó mediante MALDI-TOF-MS.	148

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I.1. Estructura química del quitosano.	18
Figura I.2. Modelo de la estructura de un oligómeros de quitosano totalmente desacetilado.	22
Figura I.3. Clasificación de las quitosanasas.	30
Figura I.4. Esquema de la envoltura celular de bacterias gram positivas y gram negativas.	35
Figura I.5. Esquema representativo del posible mecanismo antioxidante mediante los grupos amino e hidroxilo de las moléculas de quitosano.	41
Figura I.6. Esquema resumen del evento inflamatorio.....	45
Figura I.7. Esquema resumen de la cascada de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y de la vía del factor de transducción NFK β	49
Figura III.1. Esquema resumen de los diferentes procesos de obtención de COS.	61
Figura III.2. Esquema resumen de la caracterización llevada a cabo para las fracciones de COS obtenidas mediante P1, P2 y P3.....	64
Fig. IV.1. Espectro de ^1H -RMN del quitosano de partida QsA.	82
Fig. IV.2. Esquema representativo de los procesos de obtención de COS.	83
Fig. IV.3. Espectros de ^1H -RMN de los COS obtenidos mediante P1 a partir de QsB.	85
Fig. IV.4. Espectros de ^1H -RMN de los COS obtenidos mediante P2 a partir de QsB.	86
Fig. IV.5. Esquema de la degradación del quitosano con ácido nitroso.	88
Fig. IV.6. Espectros de fluorescencia obtenidos para los COS procedentes de QsA (A) y de QsB (B) mediante P2.	89

Fig. IV.7. Espectros de ^1H -RMN de los COS obtenidos mediante P3 a partir de QsB.	91
Fig. IV.8. Dependencia del patrón de acetilación (PA) versus DA.....	93
Fig. IV.9. Espectros de C^{13} -RMN de COS procedentes de QsA.....	94
Fig. IV.10. Perfiles cromatográficos de los tres procesos llevados a cabo a partir de QsB.	96
Fig. IV.11. Espectros de masas de los COS 3 ($M_w < 5$ kDa) obtenidos mediante los tres procesos a partir de QsA.	101
Fig. IV.12. Distribución y abundancia total (%) de DP detectados en los COS 3 obtenidos mediante los tres procesos.....	102
Fig. IV.13. Esquema resumen de las propiedades biológicas estudiadas.....	108
Fig. IV.14. Espectros de masas de los productos de hidrólisis tras despolimerizar con CTS los COS 1 obtenidos a partir de QsB.....	112
Fig. IV.15. Distribución y abundancia total (%) de DP detectada en de los productos de hidrólisis de COS 1 P1 y COS 1 P2 procedentes de QsB.....	113
Fig. IV.16. Capacidad para atrapar radicales libres ABTS y DPPH de los COS obtenidos mediante P1, P2 y P3 a partir de QsA (A) y QsB (B).	118
Fig. IV.17. Capacidad reductora de los COS obtenidos mediante P1, P2 y P3 a partir de QsA (A) y QsB (B).	120
Fig. IV.18. Capacidad de absorción de radicales del oxígeno de los COS obtenidos mediante P1, P2 y P3 a partir de QsA (A) y QsB (B).	121
Fig. IV.19. Variación del potencial zeta de mezclas de mucina (10 mg/ml) y COS (2,5 mg/ml) en diferentes proporciones.....	130
Fig. IV.20. Población de neutrófilos, células positivas para el anticuerpo Ly6G, aislada del exudado celular peritoneal transcurridas 24 horas desde el inicio del tratamiento.	136

Fig. IV.21. Efecto de los COS en la viabilidad de macrófagos Raw a diferentes concentraciones durante 4 h.	138
Fig. IV.22. Niveles de fosforilación de ERK1/2, JNK1/2, p38 α y factor IKB α en macrófagos	140
Fig. IV.23. Esquema resumen del efecto de los COS ensayados sobre la activación de las MAPK y la degradación del factor IKB α en macrófagos Raw	141
Fig. IV.24. Efecto de COS 2 P2 en la activación de ERK1/2 y p38 α en presencia y ausencia de polimixina (1 μ g/ml)	142
Fig. IV.25. Efecto de COS 2 P2 en la activación de ERK1/2 y p38 α en presencia y ausencia de citocalasina (10 μ g/ml).....	143
Fig. IV.26. Efecto de los COS (2 mg/ml) sobre la generación de ROS en macrófagos Raw determinado mediante citometría de flujo.....	145
Fig. IV.27. Perfiles cromatográficos de los COS 2 (M_w 10-5 kDa) obtenidos mediante los tres procesos a partir de QsA.	147

ANEXO I

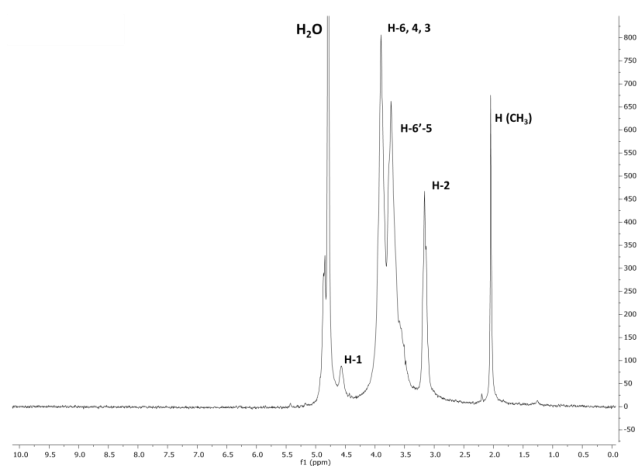


Figura 1. Espectro de ^1H -RMN del quitosano de partida QsB.

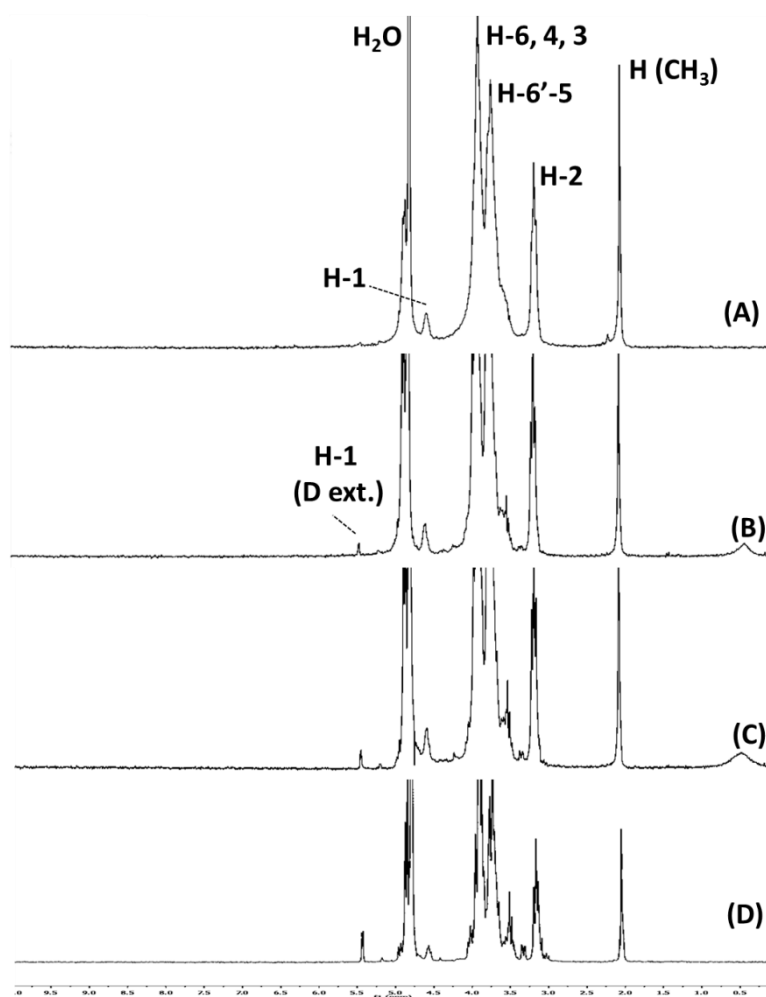


Figura 2. Espectros de ^1H -RMN de los COS obtenidos mediante P1 a partir de QsA. (A) Quitosano original QsA; (B) COS 1 (M_w 30-10 kDa); (C) COS 2 (M_w 10-5 kDa); (D) COS 3 (M_w < 5 kDa).

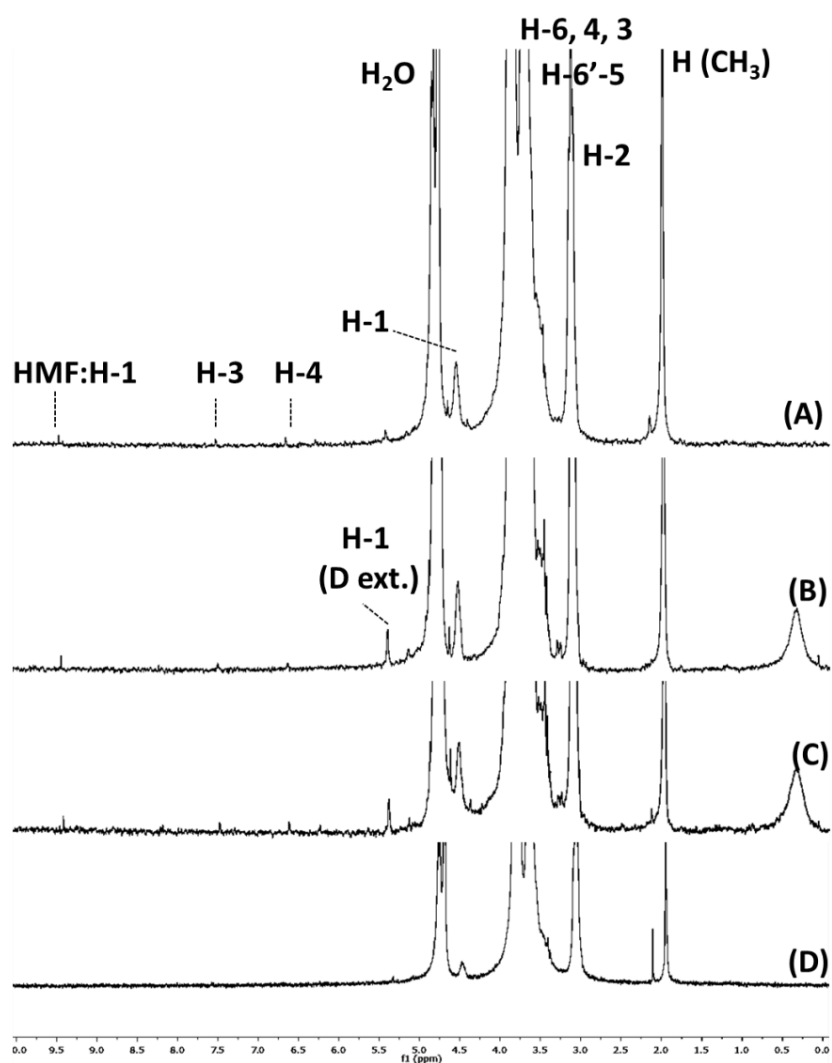


Figura 3. Espectros de ^1H -RMN de los COS obtenidos mediante P2 a partir de QsA. (A) Quitosano original QsA-Q; (B) COS 1 (M_w 30-10 kDa); (C) COS 2 (M_w 10-5 kDa); (D) COS 3 (M_w < 5kDa).

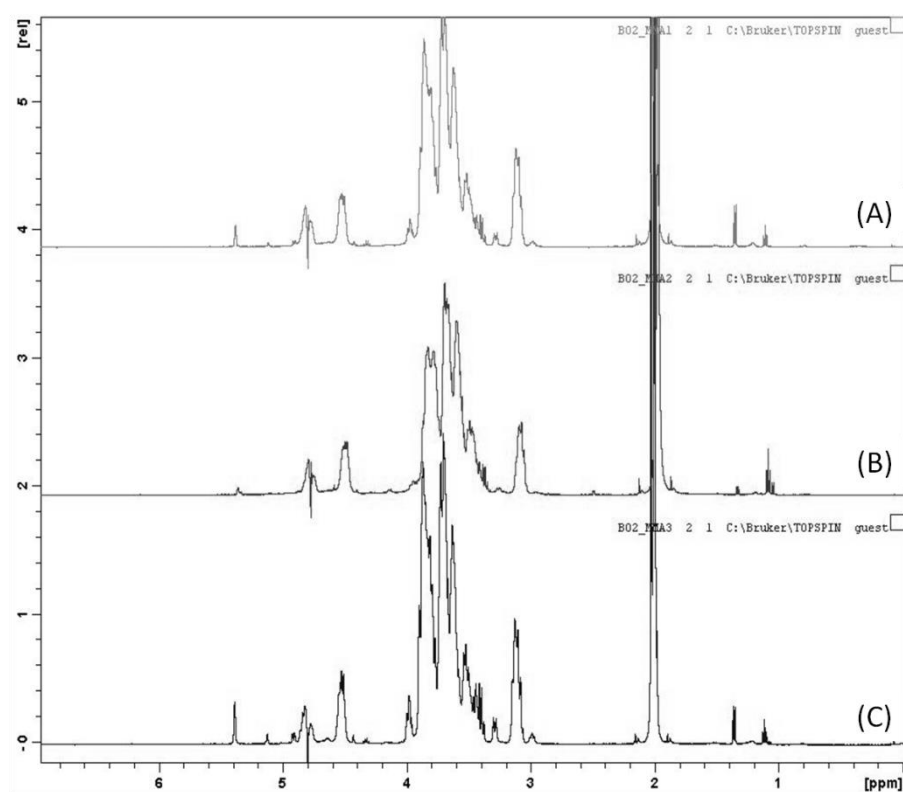


Figura 4. Espectros de ^1H -RMN de los COS obtenidos mediante P3 a partir de QsA. (A) Quitosano original QsA-R; (A) COS 1 (M_w 30-10 kDa); (B) COS 2 (M_w 10-5 kDa); (C) COS 3 (M_w < 5 kDa).

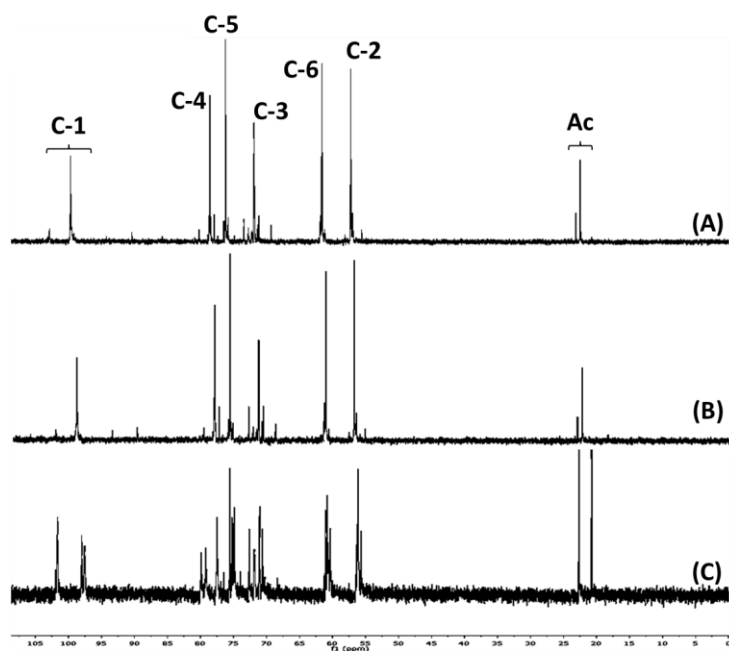


Figura 5. Espectros de ^{13}C -RMN de los COS procedentes de QsB. (A) COS 2 P1; (B) COS 2 P2; (C) COS 2 P3. La asignación de las señales se ha hecho en base a Vårum et al., (1991b) y Tømmeraas et al., (2001).

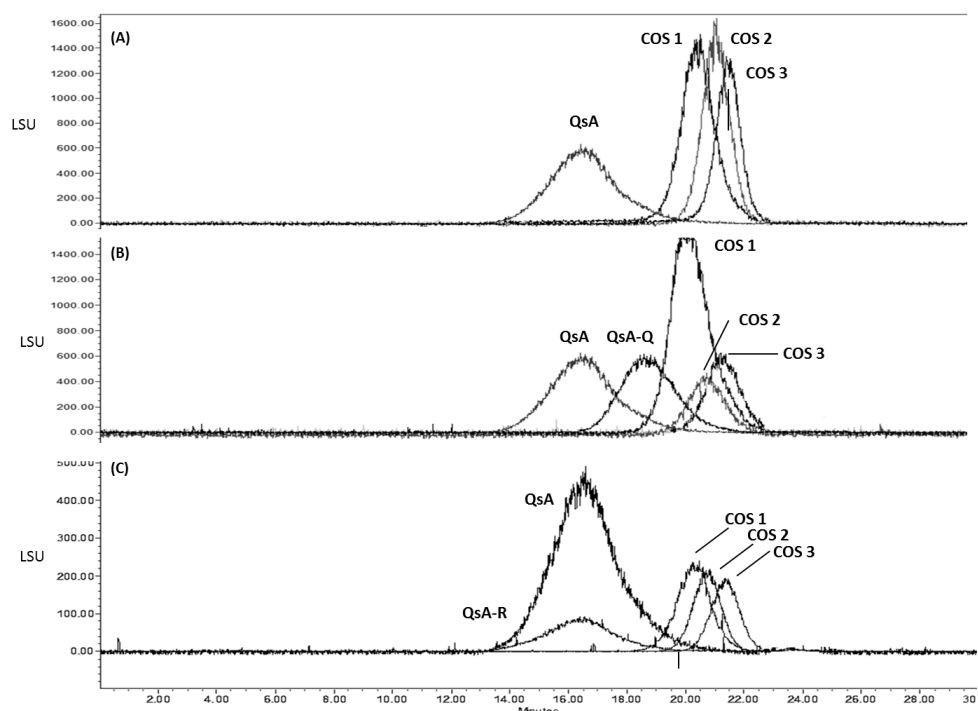


Figura 6. Perfiles cromatográficos de los tres procesos llevados a cabo a partir de QsA. (A) P1; (B) P2; (C) P3.

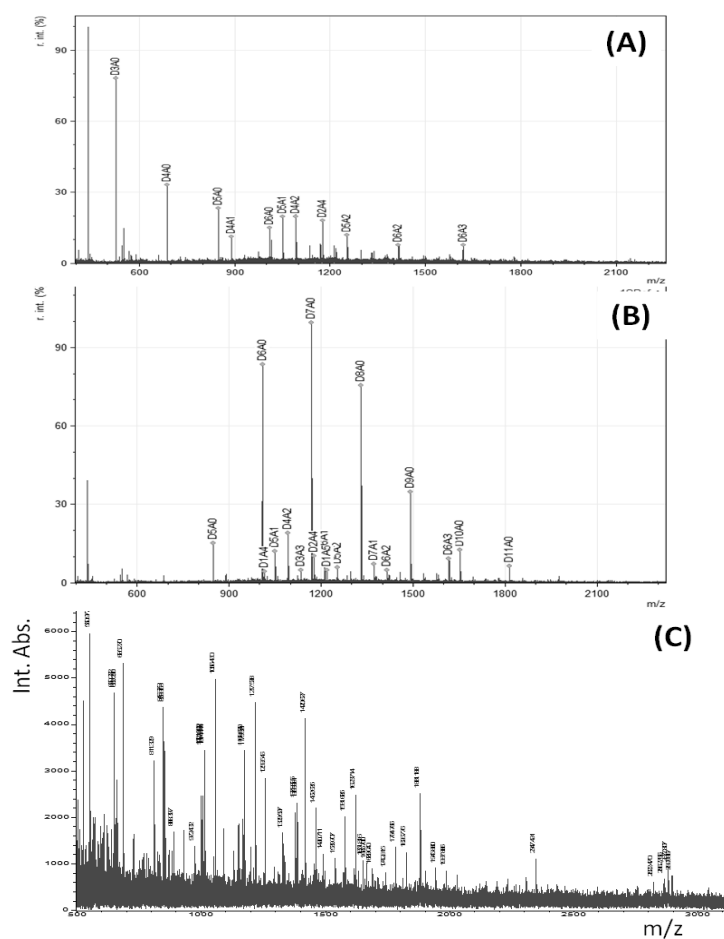


Figura 8. Espectros de masas de los COS 3 ($M_w < 5$ kDa) obtenidos mediante los tres procesos a partir de QsB. (A) COS 3 P1; (B) COS 3 P2; (C) COS 3 P3.

ANEXO II

Relación m/z detectada mediante MALDI-TOF-MS.

COS 3 P1 QsA		COS 3 P2 QsA		COS 3 P3 QsA	
m/z	Composición	m/z	Composición	m/z	Composición
524,27	D3A0	727,07	D3A1	930,45	D3A2
685,36	D4A0	846,42	D5A0	972,48	D2A3
846,49	D5A0	1007,55	D6A0	1091,53	D4A2
853,46	D0A4	1168,58	D7A0	1133,55	D3A3
888,51	D4A1	1329,65	D8A0	1294,63	D4A3
1007,59	D6A0	1490,69	D9A0	1336,62	D3A4
1014,56	D1A4	1651,76	D10A0	1455,70	D5A3
1049,61	D5A1	1812,84	D11A0	1497,73	D4A4
1091,61	D4A2			1539,73	D3A5
1168,68	D7A0			1658,80	D5A4
1175,65	D2A4			1700,81	D4A5
1210,69	D6A1			1742,78	D3A6
1217,67	D1A5			1819,87	D6A4
1329,76	D8A0				
1371,78	D7A1				
1490,85	D9A0				
1532,87	D8A1				
1651,94	D10A0				
1813,03	D11A0				

COS 3 P1 QsB		COS 3 P2 QsB		COS 3 P3 QsB	
m/z	Composición	m/z	Composición	m/z	Composición
524,19	D3A0	846,40	D5A0	524,16	D3A0
685,25	D4A0	1007,49	D6A0	650,23	D0A3
846,43	D5A0	1014,46	D1A4	685,27	D4A0
888,42	D4A1	1049,50	D5A1	811,33	D3A1
1007,48	D6A0	1091,50	D4A2	846,37	D5A0
1049,52	D5A1	1133,51	D3A3	853,36	D0A4
1091,51	D4A2	1168,56	D7A0	888,40	D4A1
1175,55	D2A4	1175,53	D2A4	972,43	D2A3
1252,59	D5A2	1210,56	D6A1	1007,46	D6A0
1413,67	D6A2	1217,55	D1A5	1014,44	D1A4
1616,74	D6A3	1252,56	D5A2	1056,46	D0A5
		1329,63	D8A0	1168,52	D7A0
		1371,65	D7A1	1175,52	D2A4
		1413,70	D6A2	1217,54	D1A5
		1490,70	D9A0	1259,55	D0A6
		1616,74	D6A3	1329,60	D8A0

	1651,78	D10A0	1378,61	D2A5
	1812,84	D11A0	1420,63	D1A6
			1462,64	D0A7
			1490,71	D9A0
			1539,71	D3A5
			1581,69	D2A6
			1623,71	D1A7
			1651,82	D10A0
			1665,70	D0A8
			1742,82	D3A6
			1784,77	D2A7
			1826,78	D1A8
			1945,88	D3A7
			1987,89	D2A8
			2877,81	D5A10

COS 1 P1 QsB		COS 1 P2 QsB	
m/z	Composición	m/z	Composición
567,00	D2A1	567,02	D2A1
769,30	D2A2	685,29	D4A0
846,34	D5A0	769,31	D2A2
888,37	D4A1	846,40	D5A0
972,48	D2A3	888,42	D4A1
1007,52	D6A0	1007,51	D6A0
1049,48	D5A1	1049,50	D5A1
1091,50	D4A2	1091,49	D4A2
1133,51	D3A3	1133,49	D3A3
1168,53	D7A0	1168,55	D7A0
1175,52	D2A4	1175,49	D2A4
1210,60	D6A1	1210,52	D6A1
1252,56	D5A2	1252,59	D5A2
1294,56	D4A3	1294,58	D4A3
1329,57	D8A0	1329,61	D8A0
1371,67	D7A1	1371,61	D7A1
1413,63	D6A2	1413,59	D6A2
1490,71	D9A0	1490,65	D9A0
1616,68	D6A3	1616,71	D6A3
1651,68	D10A0	1651,73	D10A0
1812,89	D11A0	1812,78	D11A0
1973,87	D12A0	1973,85	D12A0
		2134,92	D13A0

COS 2 P1 QsA		COS 2 P2 QsA		COS 2 P3 QsA	
m/z	Composición	m/z	Composición	m/z	Composición
500,91	D3	363,21	D2A0Na+	566,304	D2A1
566,78	D2A1	404,92	D1A1	608,891	D1A2
685,32	D4+Na	447,90	D0A2	727,067	D3A1
727,93	D3A1	524,00	D3A0Na+	769,418	D2A2
1007,57	D6+Na	566,04	D2A1	888,670	D4A1
1168,71	D7+Na	608,091	D1A2	930,670	D3A2
1329,72	D8+Na	650,124	D0A3	972,683	D2A3
1371,78	D7A1	685,191	D4A0Na+	1049,734	D5A1
1490,82	D9+Na	727,225	D3A1	1091,832	D4A2
1532,90	D8A1	769,278	D2A2	1133,859	D3A3
1651,91	D10+Na	811,337	D1A3	1175,715	D2A4
1694,98	D9A1	846,404	D5A0Na+	1210,976	D6A1
1812,91	D11+Na	853,378	D0A4	1252,894	D5A2
1855,85	D10A1	888,428	D4A1	1294,821	D4A3
1973,97	D12+Na	930,42	D3A2	1413,945	D6A2
2135,11	D13+Na	972,455	D2A3	1497,964	D4A4
2296,23	D14+Na	1007,513	D6A0Na+	1539,963	D3A5
2457,07	D15+Na	1014,482	D1A4	1617,064	D6A3
2541,23	D13A2	1049,527	D5A1	1701,168	D4A5
2619,27	D16+Na	1091,53	D4A2	1736,145	D8A2
2661,46	D15A1	1133,541	D3A3	1778,196	D7A3
2704,07	D14A2	1168,589	D7A0Na+	1819,978	D6A4
2779,43	D17+Na	1175,524	D2A4	1863,203	D5A5
2821,20	D16A1	1210,582	D6A1	1903,952	D4A6
2864,25	D15A2	1217,542	D1A5	1981,154	D7A4
2941,25	D18+Na	1252,573	D5A2	2024,066	D6A5
3024,75	D16A2	1294,597	D4A3	2066,177	D5A6
3067,38	D15A3	1329,632	D8A0Na+	2143,255	D8A4
3102,14	D19+Na	1336,656	D3A4	2185,122	D7A5
3263,09	D20+Na	1371,629	D7A1	2227,421	D6A6
3424,21	D21+Na	1378,632	D2A5	2269,170	D5A7
3746,77	D23+Na	1413,652	D6A2	2304,248	D9A4
3908,15	D24+Na	1455,65	D5A3	2346,399	D8A5
3947,38	D23A1	1532,72	D8A1	2387,960	D7A6
		1574,72	D7A2	2430,262	D6A7
		1616,728	D6A3	2465,987	D10A4
		1651,769	D10A0Na+	2507,611	D9A5
		1693,806	D9A1	2549,301	D8A6
		1736,788	D8A2	2591,166	D7A7
		1742,782	D3A6	2632,547	D6A8
		1778,814	D7A3	2660,934	D15A1
		1785,787	D2A7	2668,164	D10A5
		1812,83	D11A0Na+	2711,333	D9A6

	1854,86	D10A1	2753,121	D8A7
	1896,829	D9A2	2795,765	D7A8
	1938,863	D8A3	2836,292	D16A9
	1973,873	D12A0Na+	2871,959	D10A6
	2015,944	D11A1	2913,444	D9A7
	2058,933	D10A2	2955,184	D8A8
	2100,038	D9A3	2998,122	D7A9
	2135,91	D13A0Na+	3025,879	D16A2
	2178,899	D12A1	3075,571	D10A7
	2218,926	D11A2	3117,216	D9A8
	2261,183	D10A3	3160,977	D8A9
	2295,903	D14A0Na+	3200,375	D7A10
	2339,898	D13A1	3277,346	D10A8
	2456,969	D15A0Na+	3319,892	D9A9
	2499	D14A1	3361,89	D8A10
	2540,988	D13A2	3481,483	D10A9
	2583,893	D12A3	3523,475	D9A10
	2618,041	D16A0Na+	3556,983	D13A7
	2626,997	D11A4	3603,255	D7A12
	2780,022	D17A0Na+	3684,661	D10A10
	2941,162	D18A0Na+	3726,799	D9A11
			3965,999	D8A13

BIOFUNCTIONAL CHITOLIGOSACCHARIDES: RELATION BETWEEN PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS AND BIOLOGICAL PROPERTIES.

INTRODUCTION

As the degraded products of chitosan, chitooligosaccharides (COS) have recently been produced by several methods, such as enzymatic and acidic hydrolysis. Chitosans are a family of biocompatible and biodegradable biopolymers obtained by N-deacetylation of chitin, the most abundant natural polymer after cellulose, consisting of two monomeric units, N-acetyl-2-amino-2-deoxy-D-glucose (A units) and 2-amino-2-deoxy-D-glucose (D units) linked by β (1 \rightarrow 4) links. The degraded products COS, have a smaller molecular weight and therefore have better solubility and lower viscosity under physiological conditions because of shorter chain lengths and free amino groups in D-glucosamine units. The study of COS has been increasing not only because they come from a natural source, but also because of their biological compatibility and effectiveness. There are numerous reports on the biological activities of COS and their potential applications in food industry, pharmacy, agricultural or biomedicine. Nevertheless, in these studies it is difficult to find well defined COS in terms of physicochemical parameters, because these samples are usually poorly characterized. This makes it difficult to compare the results and to understand their mechanism of action.

Degradation of the O-glycosidic linkages of chitosan by different methods, results in COS with different numbers and sequences of A and D units as well as different degrees of polymerisation (DP). Over the past few years, several technological approaches have been taken in preparing COS, including acid hydrolysis or enzymatic methods, among others. Therefore, in order to obtain COS with different physicochemical properties, different preparation methods of COS have been developed in this work. Then, the study of the relationship between physicochemical properties of these COS and their biological activities such as natural antioxidants, antibacterial agents, mucoadhesive and anti-inflammatory effects have been studied.

METHODOLOGY

Two commercial chitosans were acquired: QsA from *Pandalus borealis* was purchased from Novamatrix (Norway). QsB from *Lithodes antarcticus* was purchased from Ideibio SL (Madrid, Spain). Then were both purified before their use.

Both chitosans were used to prepare COS by three processes. In process one (P1) chitosan was depolymerized using chitosanase EC.1.2.3.132 from *Streptomyces griseus* (Sigma-Aldrich). Separation of the products was carried out with a tangential ultrafiltration system with polyestersulfone membranes with M_w of 30, 10 and 5 kDa. Fractions of COS 1 P1 (M_w 10-30 kDa), COS 2 P1 (M_w 10-5 kDa) and COS 3 P1 (M_w < 5 kDa) were separated, dialyzed and freeze-dried for each chitosan. In process two (P2) chitosan was hydrolyzed using nitrous acid to obtain a low molecular weight chitosan named QsA-Q and QsB-Q. These chitosans were enzymatically depolymerized in the same conditions explained above for P1. Fractions of COS 1 P2, COS 2 P2 and COS 3 P2 were obtained under the same conditions explained for P1. In process three (P3) chitosan was re-N-acetylated using acetic anhydride to obtain QsA-R and QsB-R with higher DA than initial chitosan. These chitosans were enzymatically depolymerized in the same conditions explained above to P1. Fractions of COS 1 P3, COS 2 P3 and COS 3 P3 were obtained under the same conditions explained for P1.

Chitosan samples were evaluated in terms of humidity and ash contents. M_w and DA were determined by HP-SEC and spectroscopic techniques ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) respectively. COS were characterized in terms of DA, PA, M_w and DP distribution, and intramolecular composition. This was done by using MALDI-TOF mass spectrometry.

Antioxidant capacity was evaluated in all COS obtained by 4 methods: DPPH and ABTS scavenging assay, reducing power assay (FRAP) and ORAC assay. Antibacterial activity was evaluated towards *E. coli* and *Listeria monocytogenes* using COS from QsB obtained by P1 and P2, and minimal inhibitory concentration (MIC) was calculated for these samples. Mucoadhesive properties were evaluated in COS 1 and COS 2 from P1, P2 y P3 coming from QsA by zeta potential measurements of the interaction mucin-COS. Finally, anti-inflammatory effects were evaluated *in vitro* and *in vivo* experiments with the COS 2 obtained by P1, P2 and P3 from QsA.

RESULTS AND DISCUSSION

The characterization results showed that QsA had a M_w of 89.49 kDa and a DA of 17 %. QsB had a M_w of 114.74 kDa and a DA of 16 %.

COS with a random acetylation pattern were obtained in all processes carried out. In P1 an increase of reducing ends occupied by N-glucosamines compared to the original chitosans was observed. These COS showed a DA between 10 and 14 %. The COS from P2 showed a higher number of reducing ends occupied by N-glucosamines compared to those from P1. The

presence of HMF and Maillard Reaction advanced glycation ends compounds (AGEs) were detected by $^1\text{H-NMR}$. The COS showed a DA between 9 and 15 %. In P3 heterogeneous mixtures of oligomers were obtained with a DA between 31 and 47 % and with higher content of N-acetylglucosamine reducing ends.

COS originated from QsB showed a lower Mw compared to COS originated from QsA. COS 1 and COS 2 obtained by the three processes from QsA and QsB showed a Mw between 2.75 kDa and 18.86 kDa, with a PDI near to one, which showed its unimodal distribution.

Regarding the intramolecular composition and abundance of fully deacetylated oligomers of all COS 3 were observed. It was determined that all were composed of a heterogeneous mixture of oligomers with DP between 3 and 15. In COS 3 from P1 most molecules were fully acetylated or mono- and di-acetylated. COS 3 from P2 had higher abundance of fully deacetylated sequences compared to COS 3 from P1. COS 3 from P3 showed higher frequency of acetylations compared to P1 and P2 (10 acetylations). The absence of fully deacetylated molecules in COS obtained from QsA is to be noted.

Functional characterization in terms of antimicrobial activity was performed using COS from QSB from P1 and P2. The results showed that the COS from the P1 with a Mw between 5.6 and 17.2 kDa showed higher capacity to inhibit the growth of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* with respect to the COS from the P2 (Mw between 2.7 and 8.6 kDa). *E. coli* was completely inhibited growth and *Listeria monocytogenes* were inhibited by COS P1 and COS 1 P2 whose MIC values were 5 and 10 mg / ml respectively.

However, COS 1 P2 with higher content of fully deacetylated sequences showed a MIC of 10 mg / ml for both microorganisms. *E. coli* was more susceptible to the presence of COS compared to *L. monocytogenes*.

Antioxidant activity was tested with all COS obtained from QSA and QSB. The Mw of the COS is one of the determinant factors in the development of a good antioxidant capacity. Generally COS 3 fractions (Mw < 5 kDa) are the ones which showed increased activity in the trapping of DPPH and ABTS radicals, in absorption of oxygen radicals (ORAC) and in the reducing power (FRAP). Fractions of COS 3 with fully deacetylated sequences (from 0 to 88%), obtained by different processes were effective in trapping ABTS and DPPH free radicals, hydroxyl groups from the glucosamine chain showing a greater influence than amine groups. In the absorption

of oxygen radicals COS 3 fractions obtained from P2 and with a high percentage of fully deacetylated sequences were the most active.

The mucoadhesive capacity was assessed using COS 1 and 2 from QSA by all processes. The results showed that COS with \overline{M}_w between 5 and 18 kDa , and DA between 11 and 15 % showed strong mucoadhesion , being able to neutralize the negative zeta potential of mucin with 0.8 ml of COS solution (2.5 mg / ml) . COS with \overline{M}_w 8 to 18 kDa, and ~ 46 % DA had lower mucoadhesion, requiring more amount of COS to neutralize the negative potential of mucin (1 ml and 0.9 ml respectively for COS 1 P3 and COS 2P3).

The antiinflammatory effect was evaluated with COS 2 from QSA by all processes. The results showed that COS 2 P1 (Mw 8.6 kDa, DA 13%) with 42% of sequences completely deacetylated and 54% of monoacetylated oligomers showed ability to partially inhibit the inflammatory response produced by LPS in Raw macrophages. It significantly inhibited oxidative stress generated by hydrogen peroxide in this cell line and showed no cytotoxicity in experimental conditions tested. It was able to partially inhibit neutrophil migration produced by LPS into the peritoneal cavity in mice. It is produced a neutrophil activation of less than 70% than that produced by LPS. Moreover the COS 2 P3 (Mw 8.6 kDa, DA 47%) with no completely deacetylated sequences, showed a similar behavior to COS 2 P1 in Raw macrophages, in terms of the partial inhibition of MAPK and NF- κ B pathways. In mice it produced a neutrophil migration similar to that produced by LPS. In contrast, COS 2 P2 (Mw 5.0 kDa, DA 11%) with 50% of fully deacetylated sequences, showed ability to activate the ERK1 / 2 and p38a pathway, and in this case it needed to be phagocytized, demonstrating its non-involvement in the TLR4 pathway. In mice it resulted in a higher neutrophil recruitment than that produced by LPS.

CONCLUSION

The EC.1.2.3.132 chitosanase from *Streptomyces griseus* effectively hydrolyzed partially acetylated chitosans that showed a DA between 17% and 43% and an average molecular weight between 22 kDa and 114 kDa. Chitosans with similar physicochemical characteristics may exhibit different spatial conformations in solution, thus influencing the enzymatic performance and leading to having different COS in terms of chain length and composition.

The presence of N-acetylated oligomer and their balance with completely deacetylated sequences is necessary for the participation of COS in antibacterial mechanism of COS fractions, regardless of the microbial strain. The higher influence of the hydroxyl groups of COS in the electron transfer antioxidant mechanism was demonstrated. The higher influence of the amino groups, reducing ends occupied with N-glucosamine, and the presence of AGEs compounds in the donor ability of hydrogen atoms antioxidant mechanism and reducing power was demonstrated. The mucoadhesive ability of COS was demonstrated. Finally it was shown that the balance between acetylated and monoacetylated sequences allow the COS 2 to partially inhibit inflammation caused by LPS. In contrast, the predominance of completely deacetylated sequences, the higher amount of reducing ends and the presence of AGEs and HMF can cause a COS to produce inflammatory effects, so which case it needs to be phagocytosed.